

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Růstové faktory a jiné bioaktivní látky pro indukci osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk

**Growth factors and other bioactive substances for osteogenic
differentiation of mesenchymal stem cells**

Diplomová práce

Bc. Veronika BLAHNOVÁ

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Michala RAMPICHOVÁ, Ph.D.**

Praha 2016

„Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma *Růstové faktory a jiné bioaktivní látky pro indukci osteogenní diferenciací mezenchymálních kmenových buněk* zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Praze dne 21. dubna 2016

Bc. Veronika BLAHNOVÁ

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Michale Rampichové, Ph.D. za možnost zpracovat práci pod jejím vedením, za její rady a za čas, který nad prací strávila. Velice děkuji Mgr. Janě Daňkové za poskytnuté konzultace a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat celému týmu z Oddělení tkáňového inženýrství. Dík patří i mému příteli a rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Hlavní funkcí mezenchymálních kmenových buněk v organismu je zajišťovat obnovu a regeneraci poškozených tkání. Je jim přisuzována schopnost diferencovat do tkání původem z mezodermy, kam kromě jiného patří i pojiva. Díky této vlastnosti jsou objektem intenzivního zkoumání. Jednotlivé směry diferenciací je možné navodit působením specifických polypeptidů, tzv. růstových faktorů. V oblasti tkáňového inženýrství jsou růstové faktory využívány k indukci a urychlení procesů hojení. Mohou být inkorporovány do nanovláknenného nosiče vkládaného do místa defektu. Buňky v této oblasti by tak byly stimulovány jednak okolním mikroprostředím a zároveň by byl zajištěn přísun růstových faktorů ovlivňujících metabolismus, motilitu a diferenciaci buněk. K navození osteogenní diferenciací lidských MSC byly použity růstové faktory TGF- β , bFGF, HGF, IGF-1, VEGF a BMP-2 a organická kyselina taurin. Po dobu 21 dní trvajících experimentů byly tyto látky přidávány k buňkám v různých kombinacích a v případě taurinu také ve dvou různých koncentracích. Buňky byly kultivovány na plastiku. Nejlepší efekt na buněčný metabolismus MSC hodnocený MTS testem měly růstové faktory TGF- β a bFGF přidávané do media buď samostatně nebo zkombinované. Metabolickou aktivitu naopak snižovaly VEGF, HGF a 20 mM taurin. Stimulační vliv na aktivitu alkalické fosfatázy měly růstové faktory VEGF a IGF-1 samostatně nebo pokud byly kombinovány spolu a 20 mM taurin. V případech kdy byly do media přidávány s TGF- β a/nebo bFGF, které aktivitu ALP snižovaly, měly rovněž tlumící vliv. Míra mineralizace buněk byla, stejně jako aktivita ALP, negativně ovlivňována TGF- β a bFGF samostatně nebo jejich kombinací. Mineralizace byla pozitivně ovlivňována přidávkou 20 mM taurinu, HGF, IGF-1 a BMP-2 podávaným ve druhé fázi kultivace buněk (14. – 21. den), pokud nebyl kombinován s TGF- β . Exprese RunX2 byla indukována TGF- β a bFGF, stejně jako exprese kolagenu typu I. Růstové faktory mají pozitivní efekt jak samostatně, tak i v kombinaci. Kombinace více než dvou růstových faktorů se s ohledem na zvýšení metabolické aktivity a aktivity ALP jevila jako zbytečná. V některých případech byla navozena naopak inhibice.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, osteogenní diferenciací, růstové faktory, taurin

Abstract

The main function of mesenchymal stem cells in the body is to facilitate the restoration and regeneration of damaged tissues. They are known for the ability to differentiate into tissue originating from the mesoderm, which among others includes connective tissues. Due to this feature are MSCs being intensively examined. Different directions of differentiation can be induced by treatment of specific polypeptides, so called growth factors. In the field of tissue engineering are growth factors used to induce and accelerate the healing processes. They may be incorporated into the nanofiber carrier which is inserted into the site of injury. Cells in this area would thus be stimulated by surrounding 3D microenvironment. At the same time the scaffold provides a supply of growth factors which are able to affect metabolism, motility and differentiation of present cells. In order to induce osteogenic differentiation of human MSCs the following bioactive substances were used: TGF- β , bFGF, HGF, IGF-1, VEGF and the BMP-2 and the organic acid taurine. During 21 days lasting experiments, were these molecules added to the medium in various combinations and in the case of taurine also at two different concentrations. Cells were cultured on plastic. The best effect on cellular metabolism of MSCs, evaluated by MTS assay, had growth factors TGF- β and bFGF added to the culture medium either separately or combined. Decrease of metabolic activity was measured when VEGF, HGF and 20 mM taurine were added. Stimulatory effect on alkaline phosphatase activity had growth factors VEGF and IGF-1 alone or in combination, and 20 mM taurine. In cases when they were added into the medium containing TGF- β and/or bFGF, which decreased ALP activity, they also had an inhibitory effect. Mineralization rate of cells was, as ALP activity, negatively affected by supplements of TGF- β and bFGF alone or in combinations. Mineralization was positively influenced by the addition of 20 mM taurine, HGF, IGF-1 and BMP-2 which was being added in the second phase of cell cultivation (day 14 to 21), if not combined with TGF- β . RunX2 expression was induced by TGF- β and bFGF, as well as the expression of type I collagen. These growth factors have a positive effect both separately and in combination. Combining of more than two growth factors with aim to increase cell metabolism and the activity of ALP seemed to be useless. In some cases, an inhibition was induced.

Key words: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, growth factors, taurine

Obsah

Seznam zkratek	1
Úvod	5
1 Mezenchymální kmenové buňky	6
1.1 Charakteristika	7
1.2 Nika	7
1.3 Zdrojové tkáně MSC a metody izolace	8
1.4 Interakce s imunitním systémem	9
1.5 Mechanismus homingu	12
1.6 Diferenciace	12
1.6.1 Adipogeneze	14
1.6.2 Chondrogenese	14
1.6.3 Osteogeneze	15
1.7 Terapeutické využití mezenchymálních kmenových buněk	16
2 Kostní tkáň	18
2.1 Charakteristika	18
2.2 Formace kostní tkáně	19
2.2.1 Intramembranózní osifikace	19
2.2.2 Endochondrální osifikace	19
2.3 Kostní extracelulární matrix	20
2.4 Signální dráhy v osteogenezi	21
2.4.1 Wnt signální dráha	21
2.4.2 Hedgehog signální dráha	22
2.5 Transkripční faktory v osteogenezi	23
2.5.1 RunX2	23
2.5.2 Osterix	24
2.5.3 Dlx5, Msx2	25
2.5.4 Id proteiny	25
2.5.5 Další transkripční faktory	25
2.6 Růstové faktory účastníci se osteogeneze MSC	26
2.6.1 Rodina TGF- β	26
2.6.2 FGF	29
2.6.3 IGF-1	30
2.6.4 PDGF	31
2.6.5 VEGF	31
2.6.6 HGF	32
2.7 Taurin	32
2.8 Proces regenerace kosti	32
3 Tkáňové inženýrství	36
3.1 Inženýrství kostní tkáně	36
3.1.1 Kostní štěpy	37
3.1.2 Náhrady štěpů	37
3.1.3 Materiály pro kostní tkáňové náhrady a scaffoldy	38
3.1.3.1 Demineralizovaná kostní matrix (Demineralised Bone Matrix, DBM)	38
3.1.3.2 Kovy	39
3.1.3.3 Keramiky	39
3.1.3.4 Polymery	39

3.1.3.4.1	Elektrostatické zvlákňování	40
3.1.3.5	Biokompozity	41
3.1.3.6	Hydrogely	41
4	Materiál a metody	42
4.1	Chemikálie.....	42
4.2	Přístroje	43
4.3	Izolace MSC.....	43
4.4	Kultivace a pasážování MSC.....	43
4.5	Nasazování MSC.....	44
4.6	MTS test	45
4.7	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	46
4.8	Měření aktivity alkalické fosfatázy (ALP)	46
4.9	Detekce mineralizace – Alizarin Red S barvení.....	46
4.10	Vizualizace buněk – konfokální mikroskopie.....	47
4.11	RT-PCR.....	47
4.12	Statistické vyhodnocení dat	48
5	Výsledky	50
5.1	Růstové faktory	50
5.1.1	Experiment číslo 1	50
5.1.1.1	MTS test.....	51
5.1.1.2	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	53
5.1.1.3	Aktivita ALP	54
5.1.1.4	Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku.....	57
5.1.2	Experiment číslo 2	58
5.1.2.1	MTS test.....	59
5.1.2.2	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	60
5.1.2.3	Aktivita alkalické fosfatázy	61
5.1.2.4	Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku.....	62
5.1.2.5	Detekce mineralizace	63
5.1.2.6	RT-PCR	65
5.1.3	Experiment číslo 3	66
5.1.3.1	MTS test.....	67
5.1.3.2	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	68
5.1.3.3	Aktivita alkalické fosfatázy	69
5.1.3.4	Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku.....	70
5.1.3.5	Detekce mineralizace	72
5.1.3.6	Vizualizace buněk - konfokální mikroskopie	73
5.1.3.7	RT-PCR	76
5.2	TAURIN.....	77
5.2.1	MTS test	78
5.2.2	Kvantifikace obsahu buněčné DNA	79
5.2.3	Aktivita alkalické fosfatázy	80
5.2.4	Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku	81
6	Diskuze	83
7	Závěr	90
8	Zdroje	91

Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatáza
APC	anafázi podporující komplex
ATF4	aktivační transkripční faktor4
Bax	Bcl2 asociovaný protein
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor
bHLH	bazický helix-smyčka-helix
BMP-2	kostní morfogenetický protein
BMPR	receptor pro BMP
BSA	bovinní sérový albumin
BSP	kostní sialoprotein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cbfa1	alfa 1 podjednotka kóre vazebného faktoru
CBP	CREB vazebný protein
CCL	chemokin (C-C) motiv ligand
CD	diferenciační klastr
CFU-F	kolonie formující jednotky
Col	kolagen
CREB2	vazebný protein cAMP responsivních elementů
DBM	demineralizovaná kostní matrix
DHH	desert hedgehog
Dlx5	méně distální homeobox protein 5
DMP1	fosfoprotein dentinové matrix 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSH	dishevelled
ECM	extracelulární matrix
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
FABP4	vazebný protein mastných kyselin 4
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru
Flk-1	fetální jaterní kináza-1

FRS2	substrát receptoru fibroblastového růstového faktoru 2
FZD	frizzled
GDF	růstový diferenciační faktor
Gli	glioblastomové genové produkty
Gpa	gigapascal
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva
GSK3	glykogen syntáza kináza 3
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
HA	hydroxyapatit
HCl	kyselina chlorovodíková
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor-1
HLA	lidský antigen leukocytů
Hoxa2	homeobox A2 protein
HSC	hematopoetické kmenové buňky
IDO	indolamin2,3-dioxygenáza
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor
IGFBP	IGF vazebný protein
IgG	imunoglobulin G
IHH	indian hedgehog
IL	interleukin
INF-γ	interferon γ
IRS	substrát inzulinového receptoru
ISCT	mezinárodní společnost pro buněčnou terapii
Lef/Tcf	Lymfoid podporující faktor/T buněčný faktor
LPL	lipoprotein lipáza
LRP5/6	LDL receptoru příbuzný protein 5/6
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MEM	minimální esenciální medium
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MMP-1/-2	metaloproteináza-1/-2
Mpa	megapascal
MSC	mezenchymální kmenové buňky
Msx2	mesh-less homeobox protein 2
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

NaOH	hydroxid sodný
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T buněk
NF-kappa B	jaderný faktor kappa B
NGFR	receptor nervového růstového faktoru
NK	natural killer
NPP1	fosfodiesteráza nukleotid pyrofosfátu
NTP	nukleosidtrifosfát
Oct4	oktamer vazebný transkripční faktor 4
OM	osteogenní medium
OSE2	osteoblastový specifický element
Osx	osterix
PAR1	proteázami aktivovaný receptor1
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
PDGF	z destiček odvozený růstový faktor
PEG	polyethylenglykol
PGA	kyselina polyglykolová
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfatidylinozitol 3 kináza
PKC	proteinkináza C
PLA	kyselina polymléčná
PLC	fosfolipáza C
PPARγ	peroxisomální proliferátorem aktivovaný receptor γ
pRb	retinoblastomový protein
PRP	na destičky bohatá plazma
PTCH	patched
RANKL	ligand aktivující receptor jaderného faktoru kappa B
Rex1	protein zinkového prstu 42
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce
RunX2	Runt příbuzný transkripční faktor 2
SATB2	speciální na AT-bohaté sekvence vázající se protein
Sca-1	antigen kmenových buněk-1
SDF-1	od stroma odvozený faktor-1

SHH	sonic hedgehog
SMO	smoothened
Smurf1	Smad specifická E3 ubiquitin ligáza
Sox9	pohlaví determinující region Y-box 2
STAT5	signální transduktor a aktivátor transkripce
Stro-1	stromální prekursorový antigen-1
SVF	cévní frakce tukového stroma
TauT	taurinový transporter
TAZ	transkripční koaktivátor s PDZ vazebným motivem
TGF-β	transformující růstový faktor β
TIP	tenzí indukované/inhibované proteiny
TNF α	tumorový nekrotický faktor α
TRAIL	apoptózu indukující ligand
VCAM-1	adhezní molekula cévních buněk-1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor VEGF
αSMA	α aktin hladké svaloviny
β-TCP	β -trikalciemfosfát

Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (anglicky Mesenchymal Stem Cells, MSC) jsou multipotentní populací buněk, které lze pomocí vhodných biomolekul indukovat k diferenciaci do mnoha buněčných typů, zejména do buněk pojivových tkání. Právě tato vlastnost z nich činí vhodné kandidáty na využití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství, jejichž hlavním cílem je urychlení hojení poškozených tkání, případně tvorba tkáňových náhrad. V podmínkách *in vitro* jsou k diferenciaci MSC používána kultivační media s přesně definovaným složením. Jako výhodné se jeví přidávání specifických polypeptidů - růstových faktorů, kterými jsou buňky ovlivňovány prostřednictvím povrchových receptorů. Osteogenní diferenciaci je indukována především prostřednictvím TGF- β , IGF-1, HGF a BMP-2. Pro optimální působení růstových faktorů je důležitý správný časový sled a koncentrace, ve kterých jsou podávány. Zásadní vliv na diferenciaci buněk má také mikroprostředí, které je bezprostředně obklopuje – extracelulární matrix (ECM). Proto se tkáňové inženýrství snaží napodobovat přirozené mikroprostředí buněk nosiči různého druhu a vytvářet podmínky co nejpodobnější těm fyziologickým.

Hlavním cílem této práce je nalézt takové kombinace růstových faktorů a bioaktivních látek, které budou vhodné pro proliferaci a cílenou osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk *in vitro*. Získané výsledky mohou být dále využity pro vývoj nanovláknenného nosiče s inkorporovanými růstovými faktory pro dodávání bioaktivních látek a cílenou diferenciaci MSC. V průběhu degradace scaffoldu by docházelo k uvolňování růstových faktorů a stimulaci buněk. Práce je rozdělena do části teoretické a praktické. V teoretické části se budu věnovat mezenchymálním kmenovým buňkám, jejich charakteristickým znakům, diferenciačnímu a terapeutickému potenciálu, krátce také interakcím s imunitním systémem. Dále bude v práci obsažena kapitola zabývající se kostní tkání, morfologií a průběhem hojení a výstavby kosti. V neposlední řadě bude popsán jeden z možných postupů tvorby nanovláknenného nosiče. V části praktické jsou v kapitolách Materiál a metody uvedeny postupy a přístroje využívané v průběhu experimentů a seznam použitých chemikálií. Kapitola Výsledky je hlavní kapitolou této práce a jsou v ní uvedeny výstupy práce – získaná data doplněná o grafy a mikroskopické snímky.

1 Mezenchymální kmenové buňky

Obecným rysem kmenových buněk je jejich schopnost sebeobnovy. Jsou to buňky nespecializované, jež dokáží po dlouhou dobu setrvávat v inaktivním stavu a v případě potřeby začít proliferovat a diferencovat. Aktivují je stimulační molekuly uvolňované po poškození tkáně. Při dělení kmenových buněk mohou vznikat buď buňky, které si zachovaly kmenovost, nebo prekursorů buněk se specializovanou funkcí. Kmenové buňky tedy v organismu slouží jako prostředek obnovy struktury a funkce tkání po poranění. Jejich výjimečné vlastnosti je činí zajímavou možností pro terapeutické využití v oblasti regenerativní medicíny.

Jednotlivé typy kmenových buněk se liší svým diferenciačním potenciálem. Potenciál diferencovat do největšího počtu tkání mají buňky totipotentní. Dávají vznik jak embryonálním, tak extraembryonálním tkáním. Jsou to buňky zygoty. Nižším stupněm je pluripotence – kapacita diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů. Multipotentní kmenové buňky diferencují pouze do buněčných typů ze stejného zárodečného listu, ze kterého samy pocházejí. Nejnižší diferenciační potenciál značí unipotence, kdy jsou vyvíjející se buňky jen jednoho buněčného typu. Speciálním typem jsou indukované pluripotentní buňky. V organismu se fyziologicky nevyskytují. K jejich získání je třeba uměle reprogramovat nekmenovou somatickou buňku a přinutit ji exprimovat geny a faktory potřebné k dočasnému získání a udržení vlastností embryonálních kmenových buněk. Tyto buňky se používají na experimentální úrovni *in vitro*.

Myšlenka populace nehematopoetických buněk osidlujících kostní dřeň byla poprvé navržena před 150ti lety německým patologem Cohnheimem. Popisoval fibroblasty původem z kostní dřeně, které přispívají k hojení periferních tkání.¹ Později byly mezenchymální kmenové buňky popsány jako heterogenní populace, jejíž izolace byla poprvé zdokumentována v roce 1976. Buňky s fibroblastoidní morfologií byly izolovány z kostní dřeně a nazvány jako kolonie formující fibroblasty CFU-Fs. Bylo pozorováno formování kolonií při kultivaci na plastiku, po podkožní transplantaci s vhodným nosičem tvořily kost a dokázaly reorganizovat hematopoetickou niku.² Postupem času bylo zjištěno, že mezenchymální kmenové buňky, jakožto buňky multipotentní, mohou dát vznik celé řadě tkání pocházejících z mezodermy a že mohou být z také z mnoha různých tkání izolovány.^{1,3,4} V organismu jsou přítomny ve specifickém mikroprostředí, tzv. nice. Nika zahrnuje všechny faktory, které bezprostředně obklopují MSC. Jejím úkolem je udržovat buňky v naivním stavu a v případě poranění je stimulovat k migraci a diferenciaci.⁴

1.1 Charakteristika

MSC jsou buňky vřetenovitého tvaru o velikosti v řádech desítek mikrometrů v závislosti na fázi buněčného cyklu.² Svým tvarem ani velikostí se tedy nijak výrazně neodlišují od dalších skupin buněk. Jak bude uvedeno v jedné z následujících kapitol, nebyla dosud popsána ani lokalizace v rámci organismu typická pro tuto populaci kmenových buněk. Na rozdíl od některých jiných buněčných typů není znám žádný povrchový antigen, který by byl výlučně exprimován na membráně MSC. Nicméně jak pro experimentální účely, tak i pro terapeutické využití je nutné definovat znaky, na základě kterých bude možné jasně určit, že jde o mezenchymální kmenové buňky. Proto byla mezinárodní společností pro buněčnou terapii (The International Society for Cellular Therapy, ISCT) ustanovena základní kritéria, jež musí buňky splňovat, aby mohly být označovány jako „mezenchymální kmenové“. Buňky musí být schopny: 1) za standardních kultivačních podmínek adherovat na plast, 2) exprimovat povrchové antigeny CD73, CD90 a CD105 a zároveň postrádat expresi CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α a CD19, 3) *in vitro* diferencovat do adipocytů, osteoblastů a chondroblastů. „Standardní kultivační podmínky“ zahrnují minimální růstové medium s 20% FBS. Markery, které by neměly být na povrchu MSC přítomny, jsou povrchovými molekulami buněk imunitního systému, hematopoetické linie buněk a endotelu.⁵

Marker, který může být k identifikaci MSC také využíván, ale není přítomen výhradně na jejich povrchu, je Stro-1. Buňky, které ho neexprimují, nejsou schopny formovat kolonie a nemohou dát vznik podpůrnému stromatu hematopoetických kmenových buněk, což je jedna ze základní funkcí MSC v organismu.⁴ Kromě výše uvedených molekul vykazují mezenchymální kmenové buňky obvykle expresi CD271/NGFR, CD106, CD90/Thy-1, CD44, CD29, CD13, Flk-1/CD309, Sca-1 a CD10.^{4,6} Jedná se však o markery, které nejsou exprimovány konzistentně nebo jsou nespecifické a měly by tak vždy být kombinovány ještě s dalšími způsoby charakterizace populace.

1.2 Nika

Jak již bylo zmíněno, MSC se vyskytují ve velkém počtu tkání mezodermálního původu. Proto se nabízí otázka, jestli oblasti, ve kterých jsou MSC přítomny, vykazují společné znaky nebo jestli jsou buňky v daných orgánech lokalizovány náhodně a nezávisle na svém mikroprostředí. Koncept niky (v angličtině niche) kmenových buněk byl navržen Schofieldem v roce 1978.⁷ V níce jsou zahrnuty proteiny extracelulární matrix, solubilní faktory a také okolní nekmenové buňky umožňující přímý mezibuněčný kontakt přes specifické povrchové receptory. Kromě udržování kmenových buněk v nediferencovaném stavu je jejím úkolem také chránit je před hromaděním genetických mutací, které by mohly vést k rozvoji nádoru.. Nika také reguluje rovnováhu mezi symetrickým a asymetrickým

dělením čímž je zachován optimální počet buněk potřebný k opravám okolní opotřebované tkáně. Právě deregulace prostředí v nice mají zásadní vliv na vznik patologických stavů jako je tumorigeneze a různá degenerativní onemocnění.⁸

Proteinové komponenty ECM tvoří dynamicky se vyvíjející trojrozměrnou síť a svou různorodostí zajišťují specifické strukturní a biomechanické vlastnosti niky. Interakce buněk s proteiny ECM probíhá především přes transmembránové receptory integriny.⁹ *In vivo* však nebyl identifikován žádný protein ECM typicky se vyskytující v nice mezenchymálních kmenových buněk.

Nalezení konkrétních solubilních faktorů, které se podílejí na zachování kmenových charakteristik buněk v nice, by usnadnilo jejich *ex vivo* kultivaci. Nicméně všechny dosud nalezené biomolekuly vykazovaly spíše opačný efekt, tedy indukovaly diferenciaci.⁴ Jedinou výjimkou je kyslík, respektive jeho určitá koncentrace, která se v nice obvykle pohybuje v rozmezí 2-9%. V závislosti na konkrétní tkáni může však kolísat od 0,5% až do 14%.¹⁰ Kyslík působí prostřednictvím regulace exprese genů spouštěné hypoxií indukovaným faktorem HIF-1 jako je například Oct4 a Rex1. HIF-1 také vede k utlumení buněčného dýchání a dochází tak k omezené produkci reaktivních kyslíkových radikálů a snížení se pravděpodobnosti poškození DNA.¹¹

Poslední složkou niky jsou samotné buňky a molekuly exprimované na jejich povrchu. Jelikož byla zaznamenána přítomnost aktinu hladké svaloviny α (α SMA, Smooth Muscle Actin) na mezenchymálních kmenových buňkách izolovaných z různých tkání, byla navržena perivaskulární lokalizace niky MSC.¹² Následně byla potvrzena exprese Stro-1 a CD46 – antigenů asociovaných s tkání cév.¹³ Takové anatomické umístění niky by bylo praktické s ohledem na efektivní a rychlý transport buněk krevními cévami do místa potřeby prakticky kdekoli v organismu.

1.3 Zdrojové tkáně MSC a metody izolace

Jak již bylo uvedeno, mezenchymální kmenové buňky lze izolovat z celé řady tkání. Jednotlivé zdroje se mezi sebou liší náročností izolace, množstvím MSC, které se z nich dá získat a jejich diferenciačním a imunomodulačním potenciálem. Stejně tak byly popsány rozdíly na genetické úrovni a v produkci jednotlivých typů cytokinů a chemokinů.¹⁴ Základní dělení zdrojových tkání je na fetální a adultní. Z tkání organismu v prenatálním vývoji jsou izolovány ontogeneticky nejprimitivnější populace MSC, které mají nejširší možnosti terapeutických aplikací.¹⁵ Pro izolaci MSC z jakékoli tkáně obecně platí, že jejich množství, diferenciační kapacita i schopnost proliferace závisí na mnoha faktorech – věk a pohlaví dárce, jeho kondice, stravovací návyky, případně užívané léky.

Mezi tkáně plodu obsahující mezenchymální kmenové buňky řadíme tzv. Whartonovu želatinu - rosolovitou hmotu obklopující cévy pupeční šňůry, pupečnickovou krev, plodovou vodu, chorion a amnion.¹⁶ Obecně je jejich velkou výhodou snadná dostupnost, což umožňuje předejít

invazivním metodám izolace a etickým omezením. Nejběžnějším embryonálním zdrojem je pupečnicková krev. Po porodu je odebrána, prezervována zamražením a může tak být uchována pro případné pozdější využití jako autologní štěp multipotentních buněk. Její nevýhodou je nízké procento zastoupení MSC v celkovém objemu buněk (kromě MSC obsahuje také hematopoetické kmenové buňky, endoteliální prekursorů a endoteliální buňky tvořící kolonie). Po odběru tedy bývá nutná *in vitro* expanze, aby došlo k navýšení počtu buněk.¹⁷

Výčet tkání dospělého organismu obsahující populaci MSC je daleko širší. Konvenčně využívaná je kostní dřev, periferní krev a tuková tkáň. Kromě toho byla popsána izolace z chrupavky, dřev zubu, ledvin, jater, plic, nervové tkáň, slinivky, kosterní svaloviny, stroma brzlíku a sleziny, synoviální tekutiny a šlach.¹⁶ Předmětem diskuze jsou buňky získané ze zubní dřev. Mohly by totiž mít pluripotentní diferenciací potenciál a nahradit MSC z pupečnickové krve v buněčných bankách. Jsou snadno dostupné především v průběhu nahrazování mléčného chrupu stálým.¹⁷ Velmi bohatým zdrojem je tuková tkáň. Po mechanickém a enzymatickém rozrušení tkáň je suspenze centrifugována, aby došlo k oddělení zralých adipocytů od buněk cévní frakce tukového stroma (Stromal Vascular Fraction, SVF), které tvoří peletu. Mezenchymální kmenové buňky získáme odmytím neadherentních buněk po nasazení SVF na misku. Jedná se o poměrně nenáročný protokol izolace. Navíc z 1 gramu tuku můžeme dostat až 5000 MSC.¹⁸ Což je až 500x více než z odpovídajícího množství kostní dřev, v níž jsou MSC zastoupeny pouze 0,001-0,01% z celkové suspenze.³ Tuková tkáň je navíc vlastně biologickým odpadem, který by zůstal nevyužit. Porovnáme-li obě procedury izolace, jako méně rizikový, invazivní a bolestivý se jeví odběr přiměřeného množství tukové tkáň. Z hlediska možného terapeutického využití je však odběr buněk z tukové tkáň méně vhodný, protože byl zdokumentován omezený potenciál diferencovat například do chondrocytů.⁴

1.4 Interakce s imunitním systémem

Kromě schopnosti diferencovat do mnoha buněčných typů si pozornost zaslouží také další z vlastností mezenchymálních kmenových buněk – dokáží interagovat s imunitním systémem a modulovat jeho odpověď. Díky této vlastnosti mohou MSC *in vivo* podporovat sebeobnovu, proliferaci a diferenciaci HSC (z anglického Haematopoietic Stem Cells) – imunitních prekursorů a maturaci diferencovaných imunitních buněk. MSC jsou kromě výše uvedeného také tzv. nízkoimunogenní – postrádají expresi glykoproteinů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) II třídy a kostimulačních molekul CD80, CD86 a CD40 a exprese MHC I je snížena. Ani diferencované MSC neexprimují MHC II třídy, díky tomu nevyvolávají aloreaktivitu lymfocytů.^{19,20} Jsou tak potenciálními kandidáty na využití v oblasti buněčné terapie autoimunitních onemocnění, reakce štěpu proti hostiteli a k navození a udržení transplantační tolerance. *In vivo* totiž figurují například při navození periferní

tolerance nebo v těhotenství při toleranci matka-plod.²⁰ Byla provedena řada studií, které měly za cíl porovnat schopnost MSC izolovaných z různých tkání ovlivnit buňky imunitního systému. Případné rozdíly by mohly být dány mikroprostředím v ní, lokální funkcí buněk nebo jejich ontogenetickým stářím. Naprostá většina dat však ukazuje, že se MSC mezi sebou z hlediska imunomodulačního potenciálu nijak výrazně neliší. Patrná je pouze lehce zvýšená schopnost MSC izolovaných z tukové tkáně potlačovat imunitní reakci především při srovnání s MSC z kostní dřeně.²¹

Bylo prokázáno, že MSC dokáží ovlivnit jak naivní, tak i CD4+ a CD8+ T buňky. Tento děj probíhá nezávisle na MHC glykoproteinech a může být indukován i alogenními buňkami. V ovlivněných imunitních buňkách dochází ke snížení exprese cyklinu D2, zatímco exprese proteinu p27 je zvýšená, což má za následek zastavení T lymfocytů v průběhu buněčného cyklu a jejich hromadění v G0/G1 fázi.²² Je tak potlačována právě proliferace buněk namísto ovlivňování jejich zrání, produkce cytokinů nebo cytolytické aktivity. Proces, který vede k tlumení zánětlivé odpovědi T lymfocytů, je v mezenchymálních kmenových buňkách spouštěn přímým mezibuněčným kontaktem a vystavením buněk působení prozánětlivých cytokinů (např. IFN- γ a IL- β 1).²⁰ Molekuly, které jsou MSC v průběhu imunosuprese sekretovány a mohly by mít souvislost s modulací T lymfocytární reakce, jsou TGF- β , HGF, indolamin2,3-dioxygenáza (IDO) a prostaglandin E2. Mechanismus jejich účinku není zcela objasněn, nicméně jejich přítomnost vede k inhibici jaderné translokace NF-kappa B a následně k potlačení proliferace T lymfocytů.²³ Mezenchymální kmenové buňky vykazují po migraci do místa poškození také produkci oxidu dusnatého, který inhibuje fosforylaci transkripčního faktoru STAT5, jehož role je pro aktivaci a proliferaci T lymfocytů zásadní. Kromě potlačení proliferace T buněk dokáží MSC indukovat také jejich apoptózu. Určité malé množství MSC se akumuluje v sekundárních lymfatických orgánech, kde tlumí zpožděnou hypersenzitivní reakci právě indukci apoptózy aktivovaných T buněk.²²

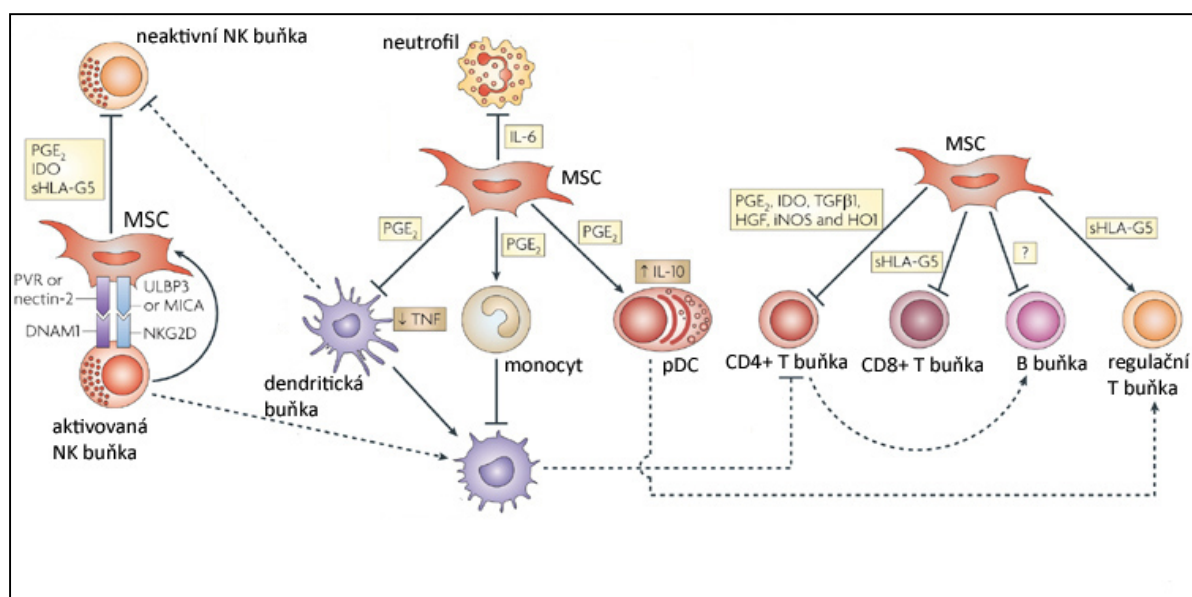
Mezenchymální kmenové buňky tlumí proliferaci a sekreci IFN- γ také další složky buněčné imunity – aktivovaných NK buněk (z anglického Natural Killers). Předpokládá se, že v tomto procesu hrají roli především prostaglandin E2 a v menší míře také TGF- β 1 a IDO. Bylo také zjištěno, že MSC dokáží tlumit cytotoxické působení NK buněk vůči buňkám exprimujícím MHC I mnohem efektivněji než vůči buňkám MHC I negativním. To je jev, který kromě jiného pravděpodobně přispívá k ochraně těla vlastních tkání před imunitním systémem.^{19,23}

Působením MSC dochází k narušování funkce dendritických buněk několika způsoby. Je například inhibována odpověď nezralých dendritických buněk na maturační signály. Což vede k inhibici jejich diferenciaci a ke vzniku buněk, které vykazují inhibiční nebo tlumící fenotyp. Dále je snížena exprese kostimulačních molekul a negativně regulována jejich schopnost stimulovat naivní T lymfocyty k proliferaci a sekreci prozánětlivého IL-12. Na výše zmíněných efektech se podílí IL-6, M-CSF kolonie stimulující faktor makrofágů a PGE2 produkované kmenovými buňkami mezenchymu.²³

Rovněž B buňky, jako složka humorální imunity, jsou mezenchymálními kmenovými buňkami ovlivnitelné fyzickým kontaktem i prostřednictvím solubilních molekul. Jedná se zejména o stejný efekt jako u T lymfocytů – zastavení dělení v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Proliferace je inhibována, pokud jsou buňky vystaveny působení anti-CD40L a IL-4.²³ MSC v přítomnosti interferonu γ produkují IDO, což vede k utlumení proliferace efektorových buněk. Doložena byla také inhibice aktivace a sekrece IgG. Na rozdíl od T lymfocytů však nebyla pozorována indukce apoptózy.²²

Mezi imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk patří také indukce regulačních T lymfocytů. Děje se tak prostřednictvím neklasického MHC I glykoproteinu HLA-G5 a pravděpodobně konstitutivně exprimovaného TGF- β . Regulační T lymfocyty mohou být také indukovány prostřednictvím dráhy spouštěné Fas ligandem na základě přímého mezibuněčného kontaktu.²¹

Obecně mezenchymální kmenové buňky modulují imunitní systém uvolňováním tří typů molekul – antagonistů receptoru IL-1, PGE2 a multifunkčních proteinů, které v cílových buňkách ovlivňují translokaci NF-kappa B do jádra.²⁴ Všechny sekretované molekuly však mají na imunitní systém podobný efekt a vedou k tlumení zánětlivých reakcí. Za fyziologických podmínek MSC exprimují také prozánětlivé cytokiny (například IL-1, IL-6, IL-8 a TNF α), nicméně pouze v rámci diference v některé buněčné typy a nikoli s cílem stimulovat imunitní systém k zánětlivé reakci.²⁵



Obrázek č. 1: **Interakce MSC s buňkami imunitního systému.** Sekrecí prostaglandinu E2 mezenchymální kmenové buňky inhibují proliferaci a cytotoxicitu NK buněk a diferenciaci monocytů v dendritické buňky. Dále je inhibována funkce CD4+ i CD8+ T buněk. Stejné mechanismy účinku má také IDO. Působením PGE2 na plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) je indukována zvýšená sekrece IL-10 a také jsou nepřímě stimulovány regulační T lymfocyty. Interakce MSC s B buňkami je pravděpodobně založena na přímých mezibuněčných kontaktech. Převzato a upraveno podle ²⁶.

1.5 Mechanismus homingu

Termín homing je využíván pro označení procesu vycestování MSC z niky a invaze poškozené tkáně, po kterém je zahájen proces obnovy. Cílová tkáň je poškozená úrazem, ischemií, zánětem, postižena nádorem nebo pouze opotřebována stárnutím. Tento jev byl *in vivo* pozorován po infarktu myokardu nebo při hojení zlomenin.²⁷ Homing se dělí do několika fází: 1) chemotaxe, 2) prvotní kontakt a rolování, 3) pevná adheze a 4) diapedéza.

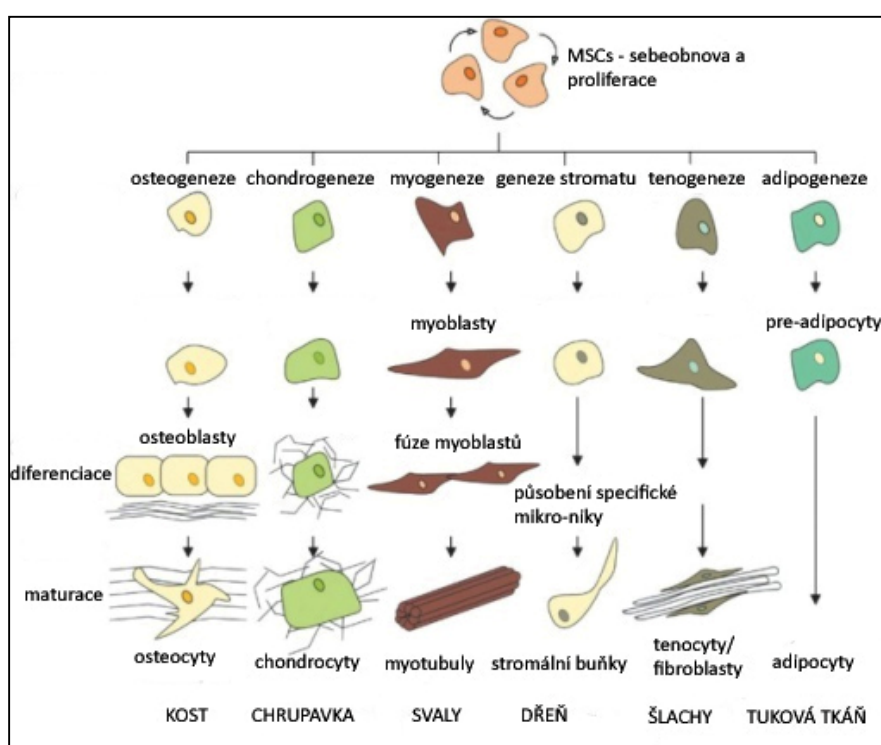
Chemotaxe je aktivována cirkulujícími chemokiny několika skupin a povrchovými strukturami, jejichž exprese je v endoteliálních buňkách zvýšena jako reakce na poranění. Ke každému typu chemokinů náleží specifický receptor spřažený s G proteinem. Mezi posttraumaticky syntetizované molekuly řadíme od stroma odvozený faktor SDF-1 (CXCL12), CCL2, CCL3, CCL4 a IL-8 – jako zástupce systémově působících solubilních faktorů, a P-selektin, E-selektin a adhezni protein cévních buněk VCAM-1 jakožto molekuly exprimované na povrchu buněk. Dále je zánětem poškozenými buňkami produkován z destiček odvozený růstový faktor PDGF, inzulinu podobný růstový faktor IGF-1, bazický fibroblastový růstový faktor bFGF, epidermální růstový faktor EGF, apoptózu indukující ligand TRAIL a INF- γ , interleukiny 6 a $\beta 1$ a TNF α . Pro tyto chemoatraktanty mají MSC na membráně extracelulární receptory.²⁸

V regulaci migrace kmenových buněk do cílové tkáně jsou zapojeny interakce receptoru CXCR4 a jeho vazebného proteinu SDF-1 α a také komplex HGF/c-Met. Tyto dvě signální dráhy mohou fungovat také synergicky.²⁹ Migraci podporují rovněž prozánětlivé cytokiny IL- $\beta 1$ a TNF- α , jejichž produkce zvyšuje hladinu matrixových metaloproteináz.³⁰ Při prvotním kontaktu MSC s endotelem cév se uplatňují P-, E- a L-selektiny. Těsná adheze probíhá přes integriny $\alpha 4/\beta 1$, které na povrchu buněk formují heterodimery a umožňují mezibuněčné interakce přes adhezni molekulu cévních buněk VCAM-1 a V-region fibronektinu.²⁸ Exprese VCAM-1 je stimulována působením IL- $\beta 1$ a TNF- α .³⁰ Diapedéza neboli extravazace je průchod buněk skrz endotel cév. Také tohoto procesu se účastní matrixové metaloproteinázy MMP-1 a -2, které fungují ve společné ose s proteázami aktivovanými receptory PAR1.³¹ Diferenciace MSC v místě poškození je zajišťována růstovými faktory a přímými mezibuněčnými kontakty v místě poranění. Například kontakt s osteoblasty dokáže buňky směřovat k diferenciaci do buněk kosti a hepatocyty indukují hepatogenezi.⁴

1.6 Diferenciace

Diferenciace je proces vedoucí ke vzniku buněk specializovaných natolik, aby mohly plnit všechny požadované funkce dané tkáně. Je indukována působením konkrétních biomolekul (např. růstových faktorů) a mezibuněčných interakcí. V první řadě zahrnuje aktivitu přesně daných

transkripčních faktorů a expresi genů specifických pro žádaný buněčný typ, které směřují progenitory k diferenciaci. Následují změny v organizaci cytoskeletu, dochází k redukci nebo naopak expanzi některých organel, je modulován metabolismus, buňky rostou a produkují komponenty extracelulární matrix. MSC běžně diferencují do tkání mezenchymu – kost, chrupavka, sval, šlacha, vazivo, podpůrné stroma hematopoetických buněk. Dále byla *in vitro* pozorována diferenciace do nervových, pankreatických a jaterních buněk.³² Vzhledem k této své fyziologické funkci jsou mezenchymální kmenové buňky slibnou možností regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Ačkoli se zdá, že diferenciační potenciál MSC je velmi široký, je třeba zmínit, že výsledná populace buněk ve většině případů nedosahuje takových biomechanických a biologických vlastností jako tkáň původní.



Obrázek č. 2: **Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk.** Převzato a upraveno podle ³³.

V oblasti tkáňového inženýrství je snaha napodobit přirozené pochody v organismu s cílem získat tkáň, jež by byla v co nejvíce směrech plnohodnotnou náhradou tkáně poškozené. Za tímto účelem jsou do kultivačního media *in vitro* přidávány růstové faktory a další bioaktivní látky v koncentraci, která má daný typ diferenciace stimulovat. Pro další zlepšení podmínek kultivace mohou být buňky nasazeny na nosičích (tzv. scaffoldech) z nejrůznějších materiálů. Tyto nosiče napodobují přirozené trojrozměrné uspořádání extracelulární matrix, v němž je na buňky vyvíjena určitá míra tlaku a tahu. V této práci bude blíže popsána adipogeneze, chondrogenese a osteogeneze – tedy hlavní směry diferenciace, které jsou kritériem pro identifikaci MSC.

1.6.1 Adipogeneze

Hlavním smyslem tukové tkáně je sloužit jako zásoba energie pro přežití delších období bez potravy, mechanicky chránit vnitřní orgány a fungovat jako tepelná izolace. Dále je využívána v plastické a rekonstrukční chirurgii pro nápravu defektů měkkých tkání způsobených úrazem nebo chirurgickým zákrokem.

V procesu diferenciaci se z preadipocytu stává zralý adipocyt sférického tvaru s vakuolami bohatými na lipidy. Jsou produkovány složky ECM zahrnující kolageny I, III, IV, V a VI, fibronektin a laminin, které společně tvoří síť. Jako markery adipogeneze lze použít lipoprotein lipázu LPL, α řetězec 2 kolagenu typu VI, leptin, adiponektin a vazebný protein mastných kyselin FABP4.³⁴

Konvenčně používanou metodou indukce adipogeneze je kultivace konfluentních mezenchymálních kmenových buněk s přidavkem glukokortikoidu dexamethasonu, 3-izobutyl-1-methylxanthinu, insulinu a indomethacinu. Méně často používanými látkami jsou trijodthyronin, askorbát-2-P a bFGF.³⁴ Hlavním regulátorem adipogeneze je peroxisomální proliferátorem aktivovaný receptor PPAR γ . Stimuluje MSC k adipogenní diferenciaci a tlumí osteogenezi. V této signalizaci byl identifikován bipotentní koregulátor TAZ - transkripční koaktivátor s PDZ vazebným motivem (PDZ je zkratka odvozená od začátečních písmen tří proteinů, v angličtině: PSD95 post synaptic density protein, Dlg1 Drosophila disc large tumor suppressor a zo-1 zonula occludens-1 protein. Funguje jako koaktivátor RunX2 a zároveň se podílí na represi PPAR γ . Buňkám tedy zabraňuje tvořit tukovou tkáň a naopak v jeho přítomnosti vzniká kost.⁴ Vedení buněk do některé z vývojových linií ovlivňují také fyzikální síly, které na ně působí. V závislosti na tom, jestli jsou MSC vystaveny mechanickému tahu, je přítomna exprese specifické izoformy tenzí indukovaných/inhibovaných proteinů TIP. Podle varianty proteinu dochází k myo- nebo adipogenezi.³⁵

1.6.2 Chondrogeneze

Vzhledem k tomu, že chrupavčitá tkáň není cévně zásobená, má v porovnání s ostatními tkáněmi velmi nízkou reparační kapacitu. Po poranění většího rozsahu tedy nedokáže spontánně plnohodnotně regenerovat a vzniká vazivová tkáň s nedostatečnými biomechanickými vlastnostmi. Využití MSC by i v této oblasti regenerativní medicíny bylo velkým přínosem pro terapeutické postupy.

Zralé chondrocyty jsou buňky kulovitého tvaru obklopené velkým množstvím extracelulární matrix tvořené především kolagenem typu II, dále jsou agregovány proteoglykany a glukosaminoglykany s vysokou molekulovou hmotností. Proteiny spjaté s formací chrupavčité tkáně jsou Sox9, kolageny II, IX, X a XI, agrekan a scleraxis.³⁴

Důležitou zásadou pro úspěšnou *in vitro* kultivaci a indukci chondrogenní diferenciaci je zajištění těsného mezibuněčného kontaktu a přidavky chondrogenních bioaktivních činitelů –

dexamethason, askorbát a TGF- β . S nižší efektivitou mohou být využity rovněž BMP, FGF a IGF.³⁴ Jednotlivé faktory spolu působí v synergii, samostatně by často nijak velký chondrogenní potenciál neměly. Konkrétní signální dráhy související s chondrogenézí nebyly plně objasněny. Roli hraje signalizace přes receptory pro TGF- β , BMP-2, -4, -6, -7, GDF a Wnt. V tzv. „downstream“ signalizaci se uplatňují například Smad proteiny, MAP kinázy a histonacetyltransferázy.⁴ Chondrogenní diferenciací mezenchymálních kmenových buněk obvykle probíhá v mediu bez přidavku séra, aby se předešlo sérem indukované apoptóze. Během apoptózy je aktivována kaspáza 3, dojde ke ztrátě integrity lysosomů a zvýšení hladiny proapoptotických proteinů a proteinu Bax. O procesu je známo pouze to, že pravděpodobně není indukován prozánětlivými interleukiny 1 α a 1 β a TNF- α . Jako vhodná náhrada séra se zdá být na destičky bohatá plazma (Platelet Rich Plasma, PRP).³⁶

1.6.3 Osteogeneze

Kostní onemocnění jsou závažným socioekonomickým problémem. Vývoj inovativních strategií reparace kosti by pomohl léčit pacienty s lokálními kostními defekty způsobenými úrazem, infekcí, nádorem, degenerativní chorobou, dědičnými poruchami nebo periprostetickou ztrátou kostní tkáně. Autologní kostní štěpy jsou často využívány pro terapii poranění páteře, rekonstrukci kloubních spojení a pro zákroky obličejové a čelistní chirurgie. Jejich použití je však limitováno dostupností a morbiditou místa odběru. Problém představuje bolestivost, možné infekce a vysoké riziko nedostatečné integrace štěpu vedoucí k dalšímu operačnímu zásahu.³⁷

V průběhu diferenciací do osteoblastů MSC nabývají kuboidální morfologie a produkují extracelulární matrix tvořenou především kolagenem typu I. V pozdějších fázích jsou přítomna centra mineralizace. Pozitivním markerem probíhající osteogeneze je zvýšená exprese alkalické fosfatázy a depozice kalcia.³⁸

Klasický diferenciační protokol zahrnuje kultivaci konfluentní vrstvy buněk s přidavky dexamethasonu, β -glycerolfosfátu a askorbátu po dobu několika týdnů. Přidávání může být vitamin D3, a růstové faktory z rodin TGF- β a BMP.³⁴ Signální dráhy uplatňující se v osteogenezi mezenchymálních kmenových buněk budou popsány v následující kapitole.

Dexamethason je syntetický glukokortikoid, jehož funkce jsou zajišťovány vazbou na glukokortikoidový responsivní element v promotorové oblasti genů souvisejících s osteogenezí. Stimuluje transkripci integrinu $\alpha 5$ a kostního sialoproteinu (anglicky Bone Sialoprotein, BSP), což jsou molekuly podílející se na aktivaci RunX2 závislé transkripce genů. Jako pozitivní regulátor transkripce se však uplatňuje pouze do úrovně fyziologické koncentrace, v koncentracích v řádu stovek nM způsobuje inhibici osteoblastových funkcí a osteoporózu. Mimo to glukokortikoidy obecně tlumí syntézu kolagenu. K dosažení kompletní indukce osteogenní diferenciací MSC je zapotřebí je s přidavkem dexamethasonu kultivovat minimálně 3 týdny.^{34,39}

Významnou úlohou askorbátu je účastnit se jako kofaktor hydroxylace prolinových a lysinových zbytků ve struktuře kolagenu.⁴⁰ Kyselina askorbová na buňky působí jako silný mitogen. Její značnou nevýhodou je nestálost v kultivačním mediu. Bývá proto nahrazena stabilnějším derivátem vitamínu C askorbát-2-fosfátem o koncentraci 0,25 mM až 1 mM.³⁴

Přítomnost β -glycerol fosfátu je naprosto esenciální pro vznik mineralizace ECM. Slouží jako substrát pro alkalickou fosfatázu. Je jí enzymaticky hydrolizován a je tak zásadním zdrojem anorganických fosfátů. Kultivace MSC v mediu s β -glycerol fosfátem vede k produkci laktátu, zvýšení aktivity ALP a produkce proteinů a fosfolipidů a v neposlední řadě k depozici anorganických látek a formaci mineralizačních center. Obvyklá koncentrace, v níž je β -glycerol fosfát přidáván do kultivačního media je 5-10 mM.^{34,41}

Kromě výše uvedených základních složek je možné do osteogenního media přidávat i další suplementy s pozitivním efektem na vznik osteoblastů. Například steroidní hormon vitamin D3, po jehož interakci s jaderným receptorem dochází ke stimulaci osteogenních transkripčních faktorů RunX2 a osterixu a osteoblastových diferenciačních markerů ALP, kolagenu I, osteokalcinu a osteopontinu.⁴²

1.7 Terapeutické využití mezenchymálních kmenových buněk

Problematika terapeutického využití specifických vlastností mezenchymálních kmenových buněk je aktuálně řešenou otázkou v mnoha vědních oborech. Potenciální terapeutické využití je nejintenzivněji studováno v případě srdečních chorob, reakce štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Disease, GVHD), jaterních onemocnění, anemie, Alzheimerovy choroby, poranění páteře, kostní defekty, mrtvice a autoimunitních onemocnění. Jejich aplikace v klinické praxi se nabízejí především z důvodu možnosti použít MSC jako autologní transplantát. Nehrozilo by tak riziko imunologických komplikací a rejekce štěpu. Atraktivní je rovněž schopnost sebeobnovy umožňující rekonstrukci systémové funkce orgánu. V neposlední řadě je zde také varianta využít MSC pro genovou terapii. Konkrétním příkladem využívání MSC v klinické praxi je přípravek *Prochymal*, který je podáván v některých případech dětským pacientům při akutní reakci štěpu proti hostiteli. Mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně jsou odebrány zdravému dárci a zamrazeny. V případě potřeby jsou infuzí aplikovány pacientovi, kde působí supresivně na jeho imunitní systém. Tlumí produkci prozánětlivých cytokinů, TNF- α a interferonu γ a proliferaci T lymfocytů.¹⁶ V březnu roku 2016 bylo v databázi klinických studií (<http://clinicaltrials.gov>) nalezeno 474 aktivních studií zabývajících se zkoumáním možných terapeutických aplikací MSC. Do naprosté většiny studií jsou zahrnuty MSC derivované z kostní dřeně.⁴³

GVHD je zánětlivá reakce, kdy dochází k napadení tkání příjemce T lymfocyty dárce. Objevuje se po transplantaci kostní dřeně. Mezi časté projevy GVHD patří vyrážka a olupování kůže a sliznic a

krvácení do intestina provázené bolestí břicha. Za normálních okolností jsou podávány imunosupresivní steroidy zabraňující jejímu vzniku. Reakce štěpu proti hostiteli však může být ke steroidům rezistentní. V takových případech jsou podány buď mezenchymální kmenové buňky se shodným haplotypem nebo je zahájena léčba výše zmíněným Prochymalem, který se stal prvním léčivým přípravkem obsahujícím MSC schváleným FDA (Food and Drug Administration).⁴³

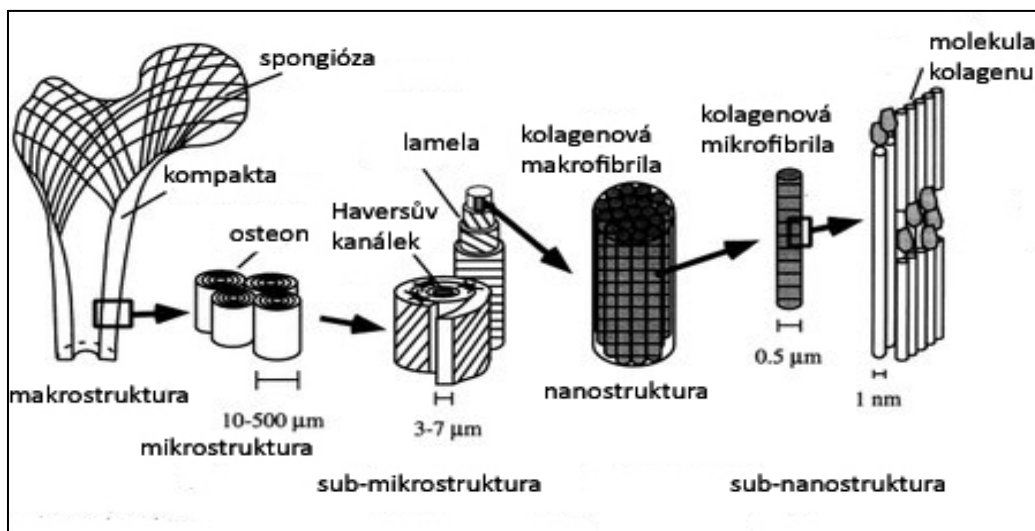
V případě jakéhokoli terapeutického podání kmenových buněk je injekční. Místo a způsob aplikace se liší v závislosti na cílové tkáni. Při terapii defektů chrupavky je dávka aplikována do kloubního pouzdra. Pokud je žádaná podpora hojení srdečního svalu například po infarktu, jsou MSC injikovány intrakoronárně. Při aplikaci infuzí do žíly je zásadně limitující fakt, že pouze 1,5 - 3,7 % buněk projde plicní bariérou a pokračuje dále do oběhu.⁴⁴

2 Kostní tkáň

2.1 Charakteristika

Kost je porózní pojivová tkáň, kterou nacházíme u všech vyšších obratlovců. Hlavní funkcí kostry je sloužit jako opora těla a poskytovat mechanickou ochranu vnitřním orgánům. Vzhledem k vysokému obsahu sloučenin vápníku a fosforu se kostra také významně podílí na udržování homeostázy iontů v těle. Kost je dynamický orgán a jeho rovnováha je udržována dvěma typy kostních buněk - osteoblasty a osteoklasty. Optimální poměr mezi pevností kostí a zároveň dostatečnou mírou pružnosti je zajišťován obsahem specifických proteinů a mineralizací ECM. V závislosti na poměru organických a anorganických složek a stavbě ECM jsou známy dva typy kostí – lamelární (kompaktní) a trámčitá (houbovitá, spongiózní), které se vzájemně morfologicky liší.⁴⁵ Lamelární kostní tkáň je tvořeno až 80% kostry. Je velmi kompaktní s hustě uspořádanou extracelulární matrix, což zajišťuje velkou biomechanickou pevnost a odolnost proti ohnutí a torzi. Je velmi silně kalcifikovaná a nachází se na povrchu kostí. Spongiózní kostní tkáň je naopak poměrně pružná, rychleji odbouratelná a může se tedy zásadně podílet na metabolismu minerálů. Je především v kloubních hlavicích kostí. Hlavními stavebními podjednotkami obou typů kostí jsou osteony.⁴⁶

Multipotentní linie mezenchymálních kmenových buněk dává vzniknout také buňkám kostním – osteoblastům. Jsou to plně diferencované buňky kuboidálního tvaru zodpovědné za produkci komponentů ECM. Mají velký Golgiho aparát a drsné endoplazmatické retikulum. Mezi sebou tvoří spojení nazývané „tight junctions“ a na plazmatické membráně mají specializované oblasti pro tvorbu váčků.⁴⁷ Jsou charakterizovány aktivitou transkripčních faktorů RunX2, Osx a ATF4, dále expresí kolagenu typu I – v počátečních fázích diferenciaci, osteopontinu, ALP a osteokalcinu – v pozdních fázích diferenciaci.⁴⁸ V průběhu dozrávání kosti dochází k uzavření některých osteoblastů do lakun v ECM a vznikají tak osteocyty.³⁸ Jejich metabolická aktivita je snížena, přesto si stále zachovávají schopnost produkce některých proteinů ECM. Jsou vzájemně propojeny vodivými spoji (anglicky gap junction) a fungují také jako mechanosenzory.⁴⁹



Obrázek č. 3: **Uspořádání kostní architektury**. Základní stavební jednotkou lamelární kosti jsou osteony tvořené koncentricky uspořádanými lamelami. Lamely jsou tvořeny lakunami s osteocyty. V jejich středu jsou Haversovy kanálky, jimiž procházejí nervy a krevní cévy. Kompakta je lokalizována na povrchu kosti, zatímco spongióza spíše v jejím centru. Převzato a upraveno podle ⁵⁰.

2.2 Formace kostní tkáně

2.2.1 Intramembranózní osifikace

Intramembranózní osifikací typicky vznikají ploché kosti lebky. Na rozdíl od osifikace endochondrální při ní nedochází k tvorbě přechodné chrupavky, ale vaziva. Mezenchymální kmenové buňky původem z neurální lišty diferencují v osteoblasty a začínají produkovat komponenty kostní ECM – kolagen a proteoglykany, které váží vápenaté soli. Vzniká tak osteoidní extracelulární matrix. Osteoblasty se následně koncentrují v okolí kalcifikovaných oblastí, tzv. osifikačních center, a postupně jsou ve vznikající ECM uzavřeny. Uvězněné buňky se mění v osteocyty. Postupující mineralizace se šíří radiálně. Další MSC průběžně nasedají na povrch a ve spodních vrstvách diferencují do osteoblastů. Kostní tkáně prorůstají krevní cévy a objevuje se červená kostní dřev. Na povrchu plochých kostí se vyvíjí periosteum tvořené vrstvami vaziva.^{51,52} Do intramembranózní osifikace je zahrnuta zejména signalizace BMP a aktivace transkripčního faktoru CBFA1.⁵³

2.2.2 Endochondrální osifikace

V průběhu endochondrální osifikace je agregovanými mezenchymálními kmenovými buňkami syntetizována hyalinní chrupavka, která je později nahrazena kostí. V MSC jsou aktivovány transkripční faktory Pax1 a scleraxis, které stimulují expresi chondrogenních genů. Chondrocyty prostřednictvím n-kadherinů kondenzují a je v nich spuštěna transkripce genu Sox9. V další fázi buňky chrupavky silně

proliferují, syntetizují chrupavčitou ECM a zvyšují svůj objem. Stávají se tak hypertrofickými. Syntetizován je kolagen typu X a fibronektin, které umožňují deponovat kalcifikaci. Zároveň jsou hypertrofickými chondrocyty sekretovány váčky s enzymy generujícími ionty fosforu a vápníku, které iniciují mineralizaci matrix v tzv. primárních osifikačních centrech. Proces osifikace pokračuje invazí krevních cév do chrupavčité matrix. Některé chondrocyty umírají apoptózou, z jiných se stávají osteoblasty, mění metabolismus z anaerobního na aerobní a chrupavka je postupně nahrazována kostí.^{51,52} Tímto typem osifikace vznikají dlouhé kosti.

2.3 Kostní extracelulární matrix

Extracelulární matrix je přirozenou mechanickou oporou pro buňky ve všech tkáních. V opěrné soustavě je její role o to zásadnější, že jsou v ní deponovány zásoby minerálních látek zpevňující kosti. Organickou složku představují z 85-90 % kolagenní vlákna – hlavně kolagen typu I a v některých fázích vývoje kosti také stopová množství kolagenu typu III a V.⁴⁵ Kolagenní proteiny svou strukturou zajišťují stabilitu a organizaci extracelulární matrix a jsou také esenciální pro počáteční fáze její mineralizace. Dále jsou v ECM přítomny kyselé nekolagenní proteiny (osteonektin, osteokalcin, osteopontin, kostní sialoprotein).⁵⁴ Asi čtvrtinu jich buňky získávají exogenně z krevního séra, většina je však syntetizována osteoblasty. Tyto proteiny mají schopnost vazby hydroxyapatitu a vápníkových iontů a jsou důležité pro proliferaci a správnou aktivitu kostních buněk.⁴⁵ Jednotlivá vlákna proteinů mohou být skládána paralelně – jako v případě kosti trámčité a povrchového periostu, nebo koncentricky.⁵⁵ Při koncentrickém uspořádání vzniká uprostřed kanálek, jímž prochází krevní céva. Toto uspořádání je typické pro kompaktní kosti a nazývá se Haversův systém. V proteinové síti jsou uloženy nanokrystaly hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Maturace matrix je asociována se zvýšenou aktivitou alkalické fosfatázy a expresí několika nekolagenních proteinů – osteokalcinu, osteonektinu a kostního sialoproteinu.⁴⁵ Zdá se, že tyto proteiny prostřednictvím regulace množství a velikosti vznikajících hydroxyapatitových krystalů napomáhají ke správné depozici minerálních látek. Samotný proces mineralizace je zahajován sekrecí váčků obsahujících vysoké koncentrace kalcia a fosfátu.⁵⁶ Fosfát je do váčku transportován prostřednictvím Na^+ -dependentního transporteru typu III, zatímco kalcium annexinovými kanály.⁵⁷ Kromě anorganických látek je ve váčkách také obsaženo nukleární jádro, na kterém je zahajována precipitace krystalů hydroxyapatitu.⁵⁶ Jako proteiny, které iniciují tvorbu krystalů, byly potvrzeny kostní sialoprotein a DMP1. Váčky také mohou obsahovat alkalickou fosfatázu (ALP) a fosfodiesterázu nukleotid pyrofosfátu (NPP1).⁵⁷ Alkalická fosfatáza je do vnější membrány exocytovaného váčku inkorporována prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Tento enzym podporuje mineralizaci prostřednictvím snižování extracelulární hladiny pyrofosfátu a zvyšování hladiny fosfátu.

NPP1 naopak proces ukládání minerálních látek inhibuje. Dochází k tomu prostřednictvím zvyšování extracelulární koncentrace pyrofosfátu, který je syntetizován z extracelulárního nukleosidtrifosfátu (NTP). Není znám mechanismus, kterým by váčky byly směřovány na konkrétní místo, nicméně mineralizace vždy začíná na koncích kolagenových vláken, se kterými váčky interagují například prostřednictvím annexinů.

2.4 Signální dráhy v osteogenezi

2.4.1 Wnt signální dráha

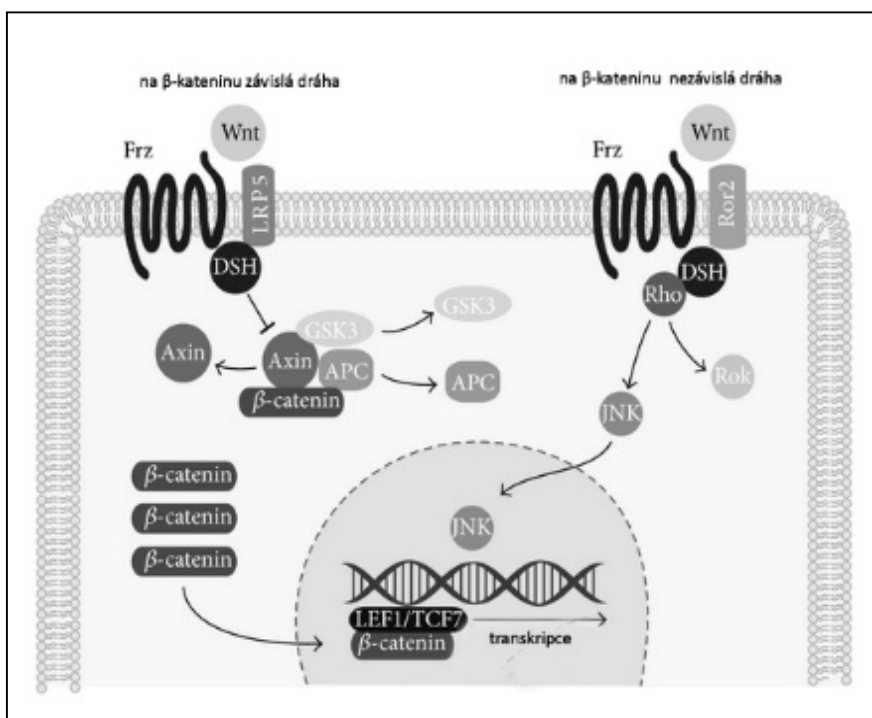
Wnt (zkratka Wingless/Int-1) jsou sekretované glykoproteiny přítomné u všech druhů živočichů.⁵⁸ V lidském genomu je kódováno celkem 19 genů pro Wnt, které se váží na povrchové buněčné receptory a v buňkách spouští děje regulující celou řadu buněčných procesů, například proliferaci, migraci, buněčný růst nebo diferenciaci. Wnt proteiny aktivují tři intracelulární signální kaskády – Wnt/ β -katenin neboli kanonickou signalizaci, Wnt/ Ca^{2+} a Wnt dráhu ustavující polaritu buněk během vývoje tkání.

Z hlediska správného průběhu osteogeneze je nejdůležitější dráha kanonická, která reguluje buněčné děje prostřednictvím zvyšování exprese β -kateninu a modifikace genové exprese transkripčním faktorem Lymfoid podporujícím faktorem/T buněčným faktorem (Lef/Tcf).⁵⁹ Signalizace je zahájena navázáním Wnt ligandu na transmembránový receptor Frizzled a koreceptory LRP5/6 (LDL receptoru příbuzný protein 5/6), se kterými interaguje intracelulární protein dishveled (DSH).^{58,60} Následně dochází k inhibici intracelulárního komplexu GSK3/axin/APC, ve kterém je bez přítomnosti Wnt fosforylovaný cytosolický β -katenin a směřován tak k degradaci.⁵⁹ Po zahájení signalizace tedy dojde ke stabilizaci β -kateninu, který může být transportován do jádra, kde heterodimerizuje s korepresorem Lef/Tcf a spouští tak transkripci genů spřažených s osteogenezí. Geny, jejichž exprese je podmíněna přítomností β -kateninu, jsou nepostradatelné pro maturaci osteoblastů a formaci kosti. Pokud je hladina molekul β -kateninu příliš nízká, dochází v osteoprogenitorových buňkách ke snížení exprese osterixu a namísto raných prekursorů osteoblastů vznikají buňky s chondrogenním fenotypem.⁶¹ Pro protein Wnt10b bylo doloženo, že indukuje expresi osteogenních transkripčních faktorů RunX2, osterixu a Dlx5.⁶² Aktivovaná kanonická dráha podporuje expresi osteoprotegerinu (OPG), jehož zvýšená hladina se projevuje atenuací osteoklastogeneze.⁶⁰ Nepatřičná aktivace Wnt signalizace přispívá ke vzniku rakoviny a naopak nedostatečně aktivovaná dráha je asociována s osteoporózou.⁵⁸ Dráha Wnt/ β -kateninu je aktivována parathormonem a estrogeny.⁶³

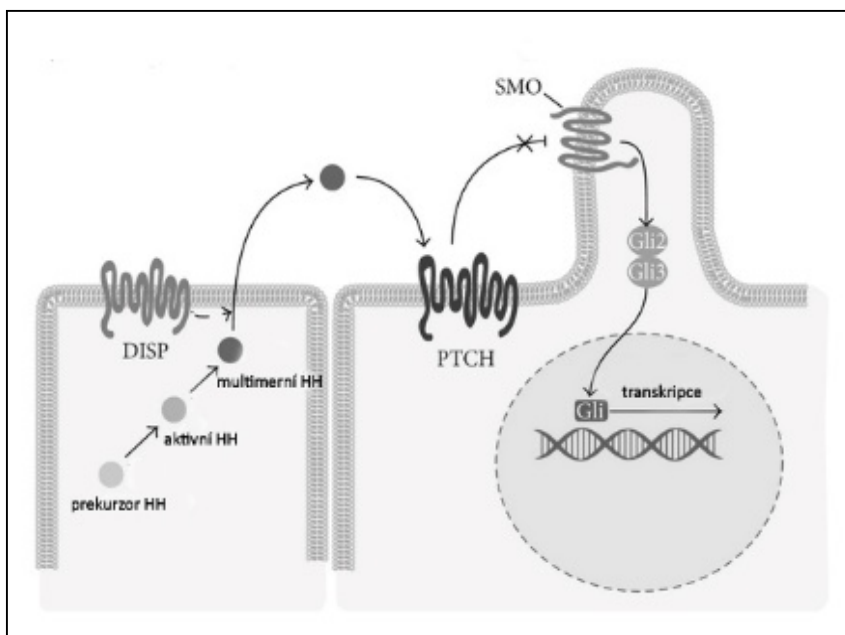
2.4.2 Hedgehog signální dráha

Rodina hedgehog proteinů byla identifikována u všech obratlovců a dělí se do skupin podle tří strukturních homologů – Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) a Desert Hedgehog (DHH), který do osteogeneze nezasahuje.⁶⁴ SHH má klíčovou roli již v průběhu embryonálního vývoje při určování kostry končetin, trupu a obličejových kostí.⁶⁵ IHH reguluje endochondrální osifikaci. SHH je během ontogeneze exprimován ve většině tkání. Využití jediného morfogenu v mnoha různých buňkách s odlišným konečným efektem je umožněno díky tomu, že buněčná odpověď závisí na typu akceptorové buňky, na počtu molekul ligandu a na době, po kterou je buňka ovlivňována.

V průběhu signalizace dochází k intracelulární konverzi prekurzorového hedgehog polypeptidu na multimerní formu proteinu, která je z buňky uvolňována prostřednictvím transmembránového proteinu Dispatched.⁶⁶ Následně se ligand váže na povrchový receptor akceptorové buňky Patched. Dojde k disociaci konstitutivně inhibovaného Smoothened, čímž je aktivována rodina transkripčních faktorů glioblastomové genové produkty Gli. Aktivovaný komplex Gli2/3 umožňuje zahájení transkripce Gli1 a zároveň inhibuje transkripční represor genu Gli3. Transkripčními faktory Gli je mimo jiné regulována exprese hlavních osteogenních regulátorů RunX2 a osterixu.⁶⁷



Obrázek č. 4: **Wnt signální dráha.** β -katenin je stabilizován vazbou WNT na receptor Frizzled (FZD) a lipoproteinovému receptoru příbuzné proteiny LRP5 a 6. Následně jsou transkribovány cílové geny β -kateninu mezi něž patří také RunX2 a Osx. Transkripci stejných genů stimuluje také cesta nezávislá na β -kateninu. Výsledkem je zrání osteoblastů. Převzato a upraveno podle ⁶⁴.



Obrázek č. 5: **Signalizační dráha hedgehog.** Vazba Indian Hedgehog (IHH) na receptor Patched (PTCH) aktivuje signalizaci přes Smoothened (SMO). Je tak inhibováno proteolytické štěpení represoru Gli3 a stimulována geneze aktivátoru Gli2. Kombinace obou stimuluje expresi osteogenních markerů RunX2 a osterixu. Převzato a upraveno podle⁶⁴.

2.5 Transkripční faktory v osteogenezi

Formování a regenerace každé tkáně je spřažena s více či méně specifickými molekulami, zajišťujícími správný průběh všech dějů. Přítomna je hormonová a cytokinová regulace a růstové a transkripční faktory. Transkripční faktory jsou obecně vzato proteiny s DNA-vazebnou doménou, umožňující jejich lokalizaci do specifické sekvence DNA a potažmo regulaci toho, který gen bude přepsán do mRNA.⁶⁸ Aktivita transkripčních faktorů je regulována například interakcemi s proteiny, které ovlivňují jejich vazbu do promotoru genů vedoucí ke změnám stavby chromatinu nebo přes posttranslační modifikace.

Klíčovými transkripčními faktory, které kontrolují správnou maturaci a funkci osteoblastů jsou RunX2 a Osterix. V menší míře je přítomna také regulace Dlx5, Msx2 a c-fos.⁶⁹ Uvedené transkripční faktory vedou k expresi kolagenu typu I, osteopontinu, osteokalcinu, kostního sialoproteinu a ALP, tedy proteinů specifických pro kostní tkáň.

2.5.1 RunX2

RunX2, nazývaný také Cbfa1, Aml3 nebo Osf2, je členem rodiny runt transkripčních faktorů, které jsou tvořeny rozdílnými α podjednotkami a vždy stejnou podjednotkou β .^{63,64} Proteiny z této rodiny regulují rozličné buněčné procesy. RunX2 je aktivován celou řadou signálních drah zahrnujících

TGF- β , BMP nebo Wnt signalizaci.⁶⁴ Regulován je také hormonální signalizací – růstovým hormonem, parathormonem, estrogeny a vitamínem D.⁶³ Kromě toho jej může aktivovat fosforylace mitogen-aktivovanou protein kinázou MAPK po vazbě kolagenu typu I na $\alpha 1\beta 2$ integriny na povrchu osteoblastů.⁷⁰ Tento transkripční faktor je esenciální v počátcích osteoblastogeneze mezenchymálních kmenových buněk a v osteoblastech je přítomen po celou dobu diferenciaci.⁶³ V pozdějších fázích vývoje osteoblastů tlumí jejich proliferaci a terminální diferenciaci. Jeho inaktivace vede ke vzniku kleidokraniální dysplazie, autozomálně dominantního onemocnění, které se projevuje abnormálním vývojem kostí.⁷¹

Molekulární mechanismus fungování RunX2 je zajišťován lokalizací transkripčního faktoru do RunX konsenzus sekvence (PuACCPuCA), známé také jako osteoblastový specifický element OSE2.⁶³ Tato sekvence je přítomna v promotorech všech hlavních genů vedoucích ke vzniku osteoblastového fenotypu. Aby mohl RunX2 interagovat s DNA, musí nejprve vytvořit heterodimer s transkripčním koaktivátorem jádro vazebným faktorem Cbfb.

Vzhledem k důležité roli při osteogenezi musí být exprese i aktivita RunX2 přísně regulována, a to rovnou na několika úrovních jeho činnosti. Děje se tak přes protein-DNA nebo protein-proteinové interakce a další transkripční faktory. Významným negativním regulátorem exprese RunX2 je homeobox A2 protein - Hoxa2, transkripční faktor náležící do rodiny Hox.⁷² Exprese transkripčního faktoru Hoxa2 je negativně regulována jaderným matrixovým proteinem SATB2, čímž je aktivována RunX2 dependentní diferenciaci osteoblastů. Dalšími negativními regulátory osteogenní diferenciaci je například Stat1, který vyvazuje cytoplazmatický RunX2, čímž je snižována jeho hladina v jádře. Dále to jsou Sox9, Sox8 nebo tumor supresorový protein p53.⁶³ Mezi pozitivní regulátory jsou řazeny například retinoblastomový protein pRb, protein tafazzin TAZ, Hoxa10. Molekula TAZ navíc obsahuje specifickou doménu, kterou přímo interaguje s RunX2 a působí tak jako koaktivátor na tomto transkripčním faktoru závislé transkripce. Dalším důležitým regulátorem činnosti RunX2 je interakce se Smad proteiny zapojenými do přenosu signálu v TGF- β signální dráze, se kterými působí synergicky. Poměrně nedávným zjištěním je také fakt, že RunX2 interaguje s faktory s aktivitou histon acetyl transferázy jako je například p300/creb vazebný protein.⁷³ Toto uspořádání umožňuje těsnou kontrolu transkripční aktivity poměrem acetylovaného a deacetylovaného chromatinu. Správná činnost RunX2 je také kontrolována na úrovni stability proteinu, kdy ubiquitin ligáza Smurf1 interaguje s C-koncovou doménou proteinu a může ho tak směřovat k degradaci v proteazomu.⁷⁴

2.5.2 Osterix

Osterix (Sp7, Osx) je transkripční faktor se třemi motivy tzv. zinkového prstu (angl. zinc finger) v C-koncové doméně.⁷⁵ Jeho hlavní funkcí je regulovat expresi markerů pozdní osteoblastogeneze a směřovat tedy preosteoblasty k vývoji do zralých osteoblastů. Transkripce osterixu je pozitivně

regulována RunX2 a osterix je pravděpodobně přítomen v osteogenní signalizaci až po aktivitě RunX2. Některé studie nicméně naznačují, že transkripce osterixu by mohla být regulována Dlx5 a na aktivitě RunX2 nezávislá.^{76,77}

Navzdory významné úloze v regulaci osteogeneze není příliš objasněn mechanismus působení osterixu. Je známa jeho interakce s jaderným faktorem aktivovaných T buněk NFAT a primárním transkripčním faktorem TF-IIB, který ovlivňuje přestavbu chromatinu.⁶⁹ Zdá se, že osterix tvoří komplex také s RNA helikázou A, což by mohl být další s mechanismů regulace osteoblastů. Aktivita osterixu je pravděpodobně dále modulována posttranslačními modifikacemi, například glykosylací nebo fosforylací.⁷⁸ Jejich vznik ani mechanismus působení však nejsou známy.

2.5.3 Dlx5, Msx2

Dlx5 (distal-less homeobox protein) a Msx2 (meshless homeobox protein) jsou členy rodiny homeobox proteinů, které mohou tvořit heterodimery a vzájemně spolupracovat nebo působit antagonisticky a jako represory nebo aktivátory figurují v diferenciaci osteoblastů.⁶³ Jednotliví představitelé této rodiny jsou exprimováni v různých fázích maturace kostních buněk. Dlx5 je přítomen ve všech stupních vývoje a jeho exprese roste v pozdních stádiích zralých osteoblastů, což s sebou nese aktivaci transkripce RunX2 a kostního sialoproteinu. Vliv Dlx5 na expresi genů osteokalcinu je nejasný.^{69,79} Je doložena jak aktivace transkripce, tak i represe. Msx2 se účastní represe transkripce kolagenu typu I a osteokalcinu.⁷⁹ Byla pozorována asociace Msx2 s neaktivním promotorem osteokalcinu v osteoprogenitorech a interakce toho samého promotoru v aktivním stavu s Dlx5 a RunX2 v postproliferativních osteoblastech.

2.5.4 Id proteiny

Id proteiny neboli inhibitory DNA vazebných proteinů ovlivňují osteogenezi prostřednictvím vazby na rodinu bazických helix-loop-helix proteinů (bHLH).⁸⁰ bHLH regulují vývoj a diferenciaci buněk prostřednictvím vazby na specifický DNA element, tzv. E -box.⁸¹ V nepřítomnosti Id proteinů je bHLH protein navázán v E-boxu a dochází tak k expresi genů vedoucích k zastavení buněčného cyklu a k diferenciaci buněk. Pokud je Id přítomen, vyvazuje jaderné helix-loop-helix proteiny a buňka je místo k diferenciaci směřována k proliferaci. Deregulace této signalizace může vést ke vzniku nádorů. Aktivita Id proteinů je kontrolována ubiquitinací.

2.5.5 Další transkripční faktory

Kromě výše uvedených transkripčních faktorů se na regulaci osteogeneze v menší míře podílí také ATF4, PPAR γ , AP1 a C/EBP.

ATF4, známý také jako CREB2 vazebný protein cAMP responsivních elementů, interaguje s RunX2 a kontroluje tak transkripční aktivitu osteokalcinu. Je regulován na úrovni posttranslačních modifikací a to fosforylací Rsk2 kinázou, která ovlivňuje jeho schopnost transportovat aminokyseliny do osteoblastů.⁸² Prostřednictvím CREB2 je zajišťována regulace Jun a Fos proteinů protein kinázou A.⁶⁹

PPAR γ , receptory aktivované proliferátory peroxisomů, jsou jadernými steroidními receptory, které jsou aktivovány polynenasycenými mastnými kyselinami.⁸³ Tyto transkripční faktory také ovlivňují formaci kosti, i když jejich hlavní funkcí je pozitivní regulace adipogeneze MSC. Mají-li PPAR navázán ligand, potlačují aktivitu osteogenních transkripčních faktorů RunX2 a osterixu. Exprese PPAR γ na jaderné membráně je redukována činností parathormonu a vitamínu D.⁶³ Protože adipocyty kostní dřeni jsou stejně jako osteoblasty derivovány z mezenchymálních kmenových buněk, může v případě převažující adipogenní signalizace prostřednictvím této dráhy docházet ke ztrátě kostní hmoty.

AP1 je transkripční faktor tvořený heterodimerem proteinů Jun a Fos rodiny.⁶³ Tato skupina proteinů zasahuje do osudu osteoblastů na mnoha úrovních. Zahajují jejich diferenciaci, dále ji modulují a ovlivňují také proliferaci a genovou expresi.

C/EBP, neboli CCAAT/enhancer vazebné proteiny, kontrolují expresi a aktivitu růstových faktorů specifických pro osteogenezi a jejich receptorů.⁸⁴

2.6 Růstové faktory účastníci se osteogeneze MSC

Růstové faktory jsou jedním z základních nástrojů tkáňového inženýrství při regeneraci tkání *in vivo* nebo směřování buněk k diferenciaci *in vitro*. Jedná se o polypeptidové signální biomolekuly, které se váží na povrchové receptory buněk a spouštějí signální kaskády, které končí expresí specifických proteinů a vznikem konkrétní tkáně. Ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci, maturaci a produkci dalších růstových faktorů. Na rozdíl od hormonů, které působí systémově, mají pouze lokální efekt a jsou sekretovány v nízkých koncentracích.

Pro indukci osteogenní diferenciaci jsou využívány a zkoumány především růstové faktory náležící do rodiny TGF- β (z anglického Transforming Growth Factor), kam kromě samotného TGF- β patří také jemu strukturně podobné BMP (Bone Morphogenetic Proteins) a GDF (Growth Differentiation Factors). Dále jsou to IGF (Insulin-like Growth Factor), FGF a PDGF.

2.6.1 Rodina TGF- β

Růstové faktory z této rozsáhlé rodiny se účastní hojení kosti a intramembranózní i endochondrální osifikace.⁸⁵ Zajišťují proliferaci a diferenciaci MSC a jejich chemotaxi na místo potřeby. Kromě samotného TGF- β sem patří BMP (Bone Morphogenetic Protein), activin nebo nodal.⁸⁶

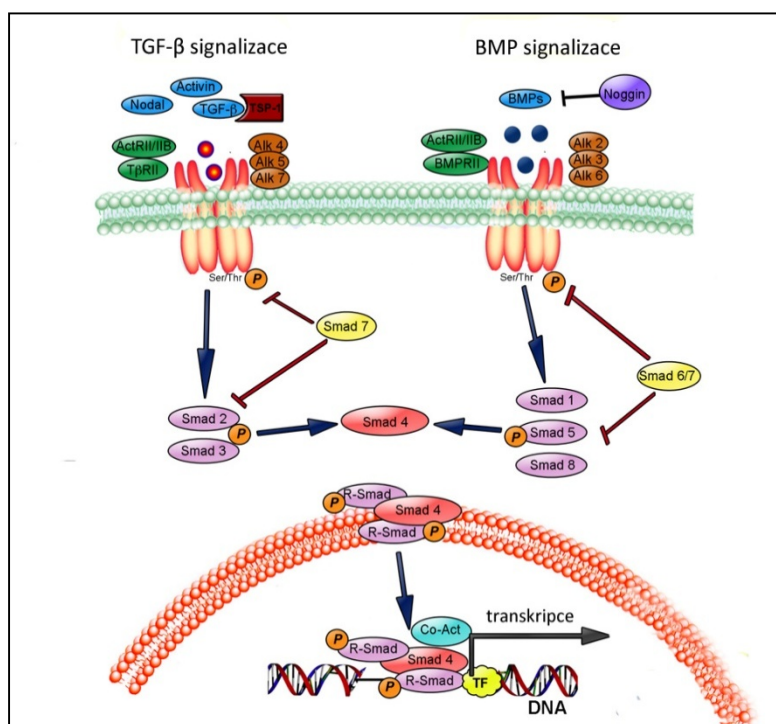
TGF- β se vyskytuje v několika izoformách, například TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. Je syntetizován makrofágy, trombocyty, mezenchymálními kmenovými i některými dalšími typy buněk jako velký prekurzor, který musí být proteolyticky štěpen, aby vznikla aktivní forma růstového faktoru tvořící dimer.^{87,88} Míra exprese TGF- β je závislá na množství matrixových proteinů kolagenu typu I a II. Uplatňuje se zde negativní zpětná vazba – Col II tlumí expresi růstového faktoru, zatímco sekrece Col II je růstovým faktorem zvyšována.⁸⁹ TGF- β tlumí produkci diferenciačního faktoru osteoklastů RANKL a omezuje tak resorpci kostní hmoty, což vede ke vzniku převahy výstavby kosti nad jejím odbouráváním.⁹⁰ Kromě toho aktivuje progenitory osteoblastů a stimuluje je k rané diferenciaci a produkci proteinů extracelulární matrix. *In vivo* zvyšuje expresi RunX2, zatímco expresi PPAR γ snižuje.⁹¹ TGF- β je také významným regulátorem procesu hojení kostí, v jehož průběhu podporuje migraci MSC do místa defektu a jejich proliferaci a diferenciaci.⁹² Působením TGF- β je silně umocněn efekt BMP-2.⁸⁶

Stejně jako TGF- β je i BMP úzce provázán s formací kostry v průběhu vývoje organismu. Bylo identifikováno kolem třiceti izoform BMP, nicméně v souvislosti s osteogenní diferenciací jsou často zmiňovány a studovány především BMP-2, 4, 5, 6 a 7.⁹² Na jejich expresi je závislá produkce osteokalcinu, diferenciačních markerů osteoblastů a zvýšené ukládání minerálních látek.⁹³ Krátkodobé vystavení buněk působení BMP-2 je nezbytné pro navození nevratné osteogenní diferenciace. Spolu s BMP-4 jsou kritickými faktory pro proliferaci a maturaci chondrocytů v rámci tvorby kosti endochondrální osifikací. BMP-2 je *in vivo* uvolňován mezenchymálními kmenovými buňkami, osteoblasty a chondrocyty.⁹² V kaskádě hojení kosti je množství mRNA této izoformy na nejvyšší hladině v čase 24 hodin od zranění, což naznačuje, že BMP-2 se účastní především počátečních fází hojení a pravděpodobně také kontroluje expresi některých dalších BMP. Například BMP-3 a BMP-4 se objevují až v době mineralizace ECM, tedy se zpožděním v řádu týdnů oproti BMP-2.⁹⁴

TGF- β /BMP signalizace probíhá přes heteromerní komplex receptorů typu I a II.⁹⁵ Ligand se váže na transmembránový receptor typu II se serin/threonin kinázovou aktivitou. Následně dojde k vytvoření komplexu s receptorem typu I, který fosforyluje intracelulární efektorové molekuly R-Smad (receptory regulované Smad). Fosforylované R-Smad se uvolní z membrány a asociují s Co-Smad (koaktivační Smad). Společně pak translokují do jádra kde spouštějí transkripci specifických genů. Intracelulární signalizace může vést také přes mitogenem aktivovanou protein kinázu MAPK, protein kinázu C PKC, fosfatidylinositol 3kinázu PI3K a malou fosfatázu C-terminální domény SCP1/2, kterými také mohou být fosforylovány Smad.^{96,86} Aktivace MAP kinázové kaskády však může být uskutečněna také nekanonickou dráhou nezávisle na Smad proteinech. A to přes TGF- β aktivační kinázu TAK1 a TAK1 vazebný protein TBP1.⁹⁷ Tato dráha vede k fosforylaci osteogenního transkripčního faktoru RunX2 a jeho asociaci s koaktivátorem transkripce osteoblastových genů CBP CREB-vazebným proteinem.⁸⁶ Poruchy TGF/BMP signalizace se projevují defektním embryonálním vývojem a onemocněními kostí jako je například osteoartrida, brachydaktylie nebo kostní nádory.⁸⁶

Aby bylo zajištěno udržování rovnováhy při výstavbě kostí, dochází také k expresi biomolekul působících jako antagonisté dané signální dráhy. K negativní regulaci dochází na několika úrovních. Jednak jsou přítomny molekuly zabraňující interakci ligandu s receptorem – jako jsou například noggin a chordin.⁸⁶ Dále může být zabráněno vazbě R-Smad na receptory typu I.⁹¹ Na receptor se naváže Smad6 a znemožní tak vazbu Smad1, 5 a 8. Receptory Smad tak nemohou být fosforylovány a nebude docházet k přenosu signálu z receptoru dále do buňky. Dalšími interakcemi jsou ovlivňovány samotné Smad proteiny. Buď mohou být označeny Smurf1 Smad ubikvitin regulačním faktorem 1, což je E3 ubikvitin ligáza, a následně směřovány k degradaci v proteazomu. Nebo může docházet ke specifické vazbě antiproliferativního proteinu Tob na Smad1, 4, 5 a 8.⁹⁸ Tob pravděpodobně ovlivňuje jadernou lokalizaci R-Smad, která vede ke spuštění negativní zpětné vazby TGF- β /BMP signalizace. Represory transkripce Ski a SnoN zamezují formaci komplexu Smad, který se váže na DNA a umožňuje transkripci osteogenních genů.⁸⁶ V neposlední řadě se uplatňují také epigenetické modifikace DNA. Jedná se především o acetylaci a deacetylaci cílových genů.

Signalizace růstovými faktory z rodiny TGF- β funguje a vzájemně se ovlivňuje s některými dalšími biomolekulami a signálními drahami.

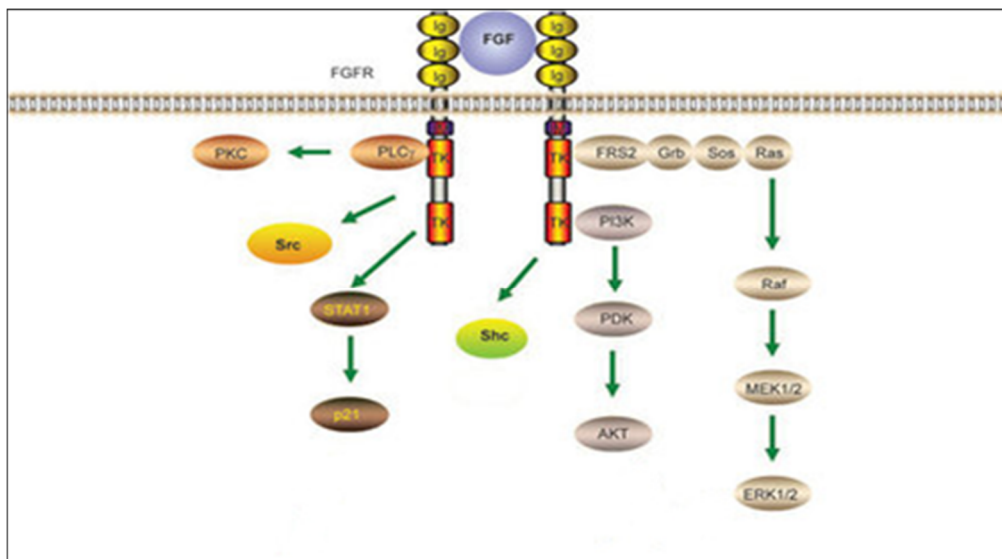


Obrázek č. 6: **Signalizace růstovými faktory z rodiny TGF- β .** Ligandy (activin, nodal, TGF- β , BMP) se váží na receptory typu I (Alk 2, 3, 4, 5, 6, 7) a typu II (ActRII/IIIB, T β R, BMPRII). Následuje fosforylace R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5, 6) a tvorba heteromerního komplexu s Co-Smad (Smad4). Celý komplex translokuje do jádra, kde interaguje s koaktivátory nebo korepresory transkripce cílových genů. Signalizační kaskády jsou inhibovány I-Smad (Smad6/7), které zabraňují aktivaci R-Smad. Převzato a upraveno podle ⁹⁹.

2.6.2 FGF

Fibroblastový růstový faktor se zapojuje do regulace vývoje kostry i postnatální osteogeneze. Jednotlivé formy jsou syntetizovány různými buňkami v různých fázích formace kosti a působí lokálně. Například FGF-2 je, stejně jako FGF-9, syntetizován mezenchymálními kmenovými buňkami a zralými osteoblasty a je skladován v ECM. FGF-18 je oproti tomu přítomen v diferencujících osteoblastech.¹⁰⁰ Obecně je účinek FGF cílen na geny důležité pro proliferaci osteoprogenitorů a diferenciaci a apoptózu osteoblastů. Pro zahájení signalizace musí dojít k vazbě FGF na vysokoafinitní receptor FGFR typu 1, 2 nebo 3, přičemž každý z typů má dvě sestřihové varianty.¹⁰⁰

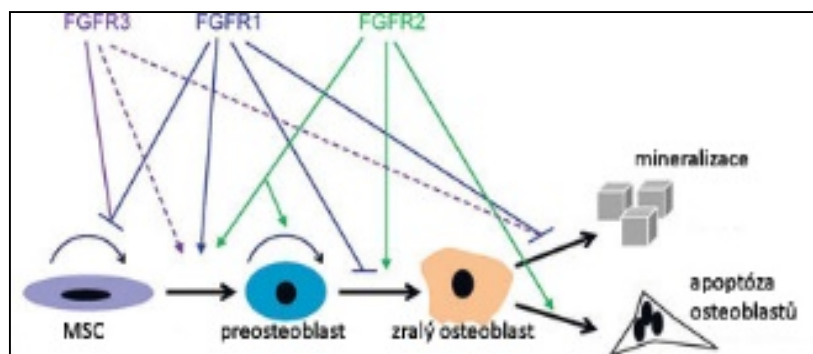
Navázání růstového faktoru vede k dimerizaci receptoru s tyrosin kinázovou aktivitou a fosforylaci intracelulárních tyrosinových zbytků receptoru. Zásadní krok pro zahájení proliferace prekursorů osteoblastů a jejich následnou diferenciaci je aktivace dráhy extracelulárním signálem regulované kinázy ERK1/2 a následné zvýšení transkripční aktivity RunX2. Vazba ligandu na receptory aktivuje rovněž fosfolipázu C a PI3 kinázu, přičemž signalizace zahrnující PLC a PKC vede ke zvýšení exprese RunX2 a k produkci kolagenu typu I a dalších komponent extracelulární matrix. Oproti tomu je dráha PI3K/PKB na expresi RunX2 nezávislá.^{101,102} Na základě signální dráhy aktivované fibroblastovým růstovým faktorem je ovlivněna míra syntézy také dalších transkripčních faktorů souvisejících s osteogenní diferenciací mezenchymálních kmenových buněk – například Sox2, Twist1 a bHLH.¹⁰¹



Obrázek č. 7: **Signalizace přes FGF receptor.** Vazba ligandu na receptor indukuje jeho dimerizaci, aktivaci kináz a transfosforylaci tyrosinových zbytků FGFR. Je tak indukována signalizace MAP kinázami, PI3 kinázou a fosfolipázou C. Převzato a upraveno podle ¹⁰³.

Optimální efekt FGF signalizace je, stejně jako u ostatních růstových faktorů, zajišťován vzájemnou komunikací jednotlivých signálních drah a molekul. Pozitivní efekt FGF/FGFR je zesilován například kanonickou Wnt-β katenin dráhou.¹⁰⁴ FGF-2 snižuje expresi nogginu – negativního regulátoru

BMP signalizace a podporuje tak formaci kostí závislou na této biomolekule. Proces regulace FGF signalizace je zajišťován také na úrovni samotného receptoru. Stejně jako ostatní receptorové tyrosin kinázy je i FGF receptor regulován negativní zpětnou vazbou prostřednictvím internalizace a degradace receptoru v proteazomu, což vyžaduje interakci receptoru s dokovacím proteinem FRS2 a ubiquitin ligázou Cbl.¹⁰¹ Účinnost FGF signalizace je závislá také na specifické časové a místní expresi jednotlivých typů receptorů. FGFR1 a 2 jsou přítomny na zralých osteoblastech i progenitorových buňkách. V případě progenitorů jsou doplněny ještě o FGFR3.¹⁰⁰



Obrázek č. 8: **Funkce FGF receptorů v diferenciaci osteoblastů.** Signalizace přes FGFR1 vede ke vzniku preosteoblastů a inhibuje procesy v pozdní fázi diferenciaci. Signalizace přes FGFR2 je oproti tomu zásadní pro indukcí dějů v pozdních fázích. Převzato a upraveno podle¹⁰³.

2.6.3 IGF-1

Největší objem syntézy inzulinu podobnému růstového faktoru 1 probíhá v játrech, v menší míře je však produkován také ve většině ostatních tkání, včetně tkání pojivových. V kostní tkáni je sekretován zralými osteoblasty a to pod kontrolou růstového hormonu, parathormonu nebo prostaglandinu 2.^{105,106} IGF-1 neovlivňuje nediferencované buňky v raných fázích vývoje kosti, ale uplatňuje se až u maturovaných osteoblastů, v nichž podporuje expresi osterixu, osteokalcinu, Col I a některých prozánětlivých cytokinů zahajujících osteoklastogenezi. Samotné osteoklasty jsou jím též ovlivňovány. Tento růstový faktor moduluje také některé funkce chondrocytů a je zásadní pro správný průběh endochondrální osifikace.^{107,108}

Vazba růstového faktoru na receptor IGFR1 vede k autofosforylaci tyrosinových zbytků jeho β podjednotky, což vede k aktivaci dalších intracelulárních interakčních partnerů. Jedná se o proteiny IRS a Shc. Substráty inzulinového receptoru IRS jsou v buňkách přítomny ve čtyřech variantách – 1, 2, 3, 4. V buňkách kostí jsou exprimovány IRS1 a IRS2. IRS1 aktivuje PI3 kinázu, zatímco adaptorový protein Shc tvoří komplex s Grb2 a uvádí tak v činnost ERK a MAP kinázy.¹⁰⁹ Signalizací přes PI3 kinázu je ovlivňován především mitochondriální metabolismus. IGF-1 také aktivuje transportéry glukózy a zvyšuje tak její příjem buňkami.¹⁰⁸

Inzulinu podobné růstové faktory jsou v inaktivním stavu vázány v kostní matrix, odkud jsou v případě resorpce kosti uvolňovány. Přítomny jsou v komplexu s IGF vazebnými proteiny IGFBP. Je jich několik typů, které jsou lokalizovány v různých částech kosti. Jejich exprese může být redukována například TGF- β .¹¹⁰

2.6.4 PDGF

PDGF neboli z krevních destiček odvozený růstový faktor je sekretován z alfa granúl krevních destiček, endoteliálních buněk, makrofágů a osteoklastů.¹¹¹ Syntetizován je v několika izoformách (A, B, C, D), které spolu musí tvořit homo- a heterodimery, aby získaly biologickou aktivitu. Následně se váží na receptory dvojího typu – α a β . Interakce s receptorem jsou spouštěny signální dráhy dvou kináz – PI3K a MAPK.¹¹²

Tento růstový faktor působí na osteoblasty chemotakticky a podporuje jejich proliferaci. Účastní se také procesu remodelace pojivových tkání prostřednictvím stimulace kolagenáz. V neposlední řadě zesiluje mineralizaci kostní matrix a zvyšuje její hustotu.¹¹²

2.6.5 VEGF

VEGF (z anglického Vascular Endothelial Growth Factor) patří do skupiny angiogenních růstových faktorů a v průběhu vzniku a hojení kostní tkáně je důležitý především z pohledu krevního zásobení. Rodina VEGF zahrnuje 7 členů, nejhojněji zastoupeným je VEGF-A.¹¹³ Jeho přítomnost vede MSC k diferenciaci do buněk endotelu a k formaci krevních cév.¹¹⁴ Tento proces je pro vznikající kostní buňky naprosto zásadní s ohledem na dostupnost živin a kyslíku a samotná osteogeneze je s ním úzce spjata. Kromě angiogeneze však hraje roli i při endochondrální a intramembranózní osifikaci. Účastní se diferenciace osteoblastů a působí chemotakticky na osteoklasty a osteoprogenitorové buňky.¹¹³

Všichni zástupci rodiny VEGF mají společnou homologní doménu skládající se z osmi cysteinových zbytků. Biologický efekt je zprostředkován vazbou růstového faktoru na jeden ze specifických receptorů VEGF receptor 1 nebo 2. V obou případech se jedná o tyrosin kinázy, které následně aktivují signalizaci například přes PI3 kinázu nebo fosfolipázu C. Signalizace z receptoru typu 2 je hlavním regulátorem chemotaxe a cytoskeletální reorganizace. Funkce VEGFR-1 není plně objasněna. Při vazbě ligandu na receptor se v některých případech uplatňují také koreceptory neuropilin-1 a -2, které běžně fungují jako receptory pro semaforiny.^{113,115}

V primárních osteoblastech zvyšuje VEGF aktivitu alkalické fosfatázy a podporuje mineralizaci. V počátcích diferenciace je jeho hladina nízká a k maximální expresi dochází až v terminální fázi osteogeneze.¹¹⁴ V prekurzorech osteoklastů dochází působením VEGF ke zvýšené míře exprese proteinu RANK – receptoru pro RANKL, jehož prostřednictvím dochází k aktivaci prekurzorů a vzniku činných osteoklastů.¹¹³

Sekrece VEGF je vyvolána zvýšením hladiny hypoxií indukovaného faktoru HIF a to buď jako reakce na snížení koncentrace kyslíku nebo například na základě působení IGF-1.¹¹⁵

2.6.6 HGF

Hepatocytární růstový faktor je molekulou s pleiotropním účinkem. Účastní se mnoha procesů probíhajících jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celého organismu. Namátkou lze jmenovat buněčnou proliferaci, motilitu a diferenciaci, organogenezi, hojení tkání a v neposlední řadě také remodelaci kosti a udržování homeostázy kostní tkáně.¹¹⁶

Signalizace probíhá přes receptor c-Met s tyrosin kinázovou aktivitou. Dále je aktivována kaskáda zahrnující fosforylaci ERK, AKT/PI3K a p38 MAP kinázy. MAPK p38 indukuje zvýšení exprese transkripčních faktorů RunX2, osterixu, osteokalcinu a osteoprotegerinu. RunX2 jí je fosforylován, čímž je zajištěna jeho stabilizace v buňce. HGF také vede k indukci exprese BMP-4, dalšího růstového faktoru ovlivňujícího vznik kostních buněk.^{117,116}

Efekt HGF na diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk pravděpodobně závisí na jeho koncentraci. Nízké koncentrace v řádu desítek ng/ml osteogenezi stimulují, zatímco koncentrace v řádu stovek ng/ml ji naopak tlumí.¹¹⁸

2.7 Taurin

Taurin neboli 2-aminoethansulfonová kyselina je neesenciální organická kyselina volně přítomná ve většině savčích tkání. Do buněk se dostává taurinovým transportérem TauT symportem s Na⁺ ionty. Jedná se o stejný transportér, který je využíván pro přenos β -aminokyselin.¹¹⁹ Tento přenašeč je exprimován osteoblasty.¹²⁰

V buňkách aktivuje ERK1/2 signální kaskádu. Stimuluje tak aktivitu ALP, expresi transkripčních regulátorů RunX2 a osterixu a sekreci matrixových proteinů osteokalcinu a osteopontinu. Zvyšuje také depozici minerálních látek v kostní ECM. Jako negativní regulátor působí při osteoklastogenezi.¹²⁰

2.8 Proces regenerace kosti

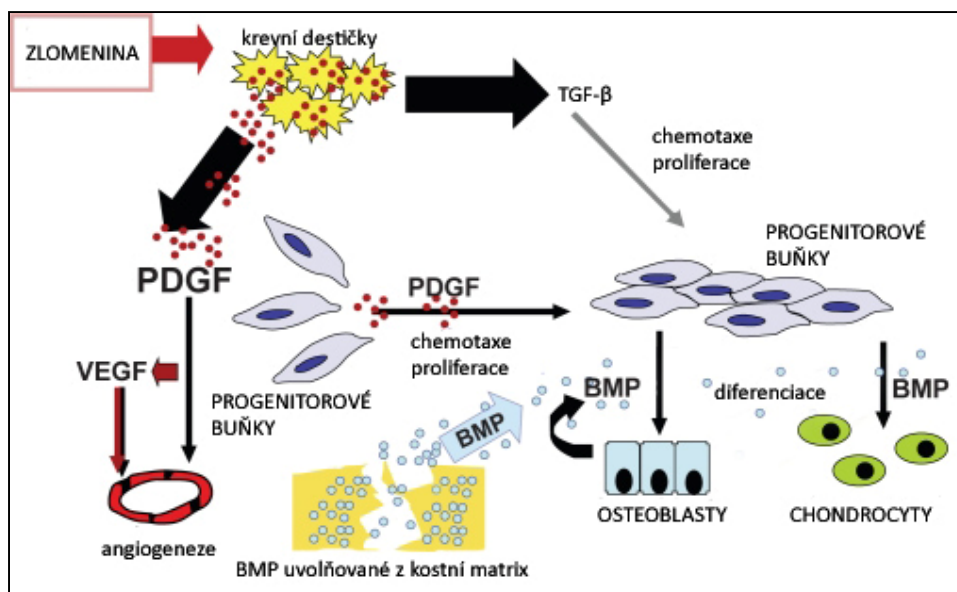
Zlomeniny jsou nejčastějším traumatem velkých orgánových soustav u lidí. Rychlé a úspěšné zhojení fraktury je velmi komplexním procesem a ovlivňuje ho celá řada faktorů. Záleží například na typu a rozsahu fraktury, věku pacienta, na jeho zdravotním stavu a na výživě. Pokud jsou podmínky optimální, zlomenina je přirozenou cestou zhojena v průběhu několika týdnů. Přibližně v 10 % případů však dochází ke komplikacím, kdy je nová kostní tkáň syntetizována příliš pomalu, případně není syntetizována vůbec.¹²¹ Nově vzniklá kost také může mít nedostačující biomechanické a strukturní vlastnosti, díky čemuž není jako náhrada funkčně plnohodnotná. V takových situacích přichází na řadu

tkáňové inženýrství s možností využít implantáty z rozličných materiálů a také s postupy, jak prekursorů kostních buněk stimulovat k žádané aktivitě.

V průběhu fyziologického hojení zlomeniny dochází vlastně k rekapitulaci procesu vzniku kostry během embryonálního vývoje. Při obnově kosti jsou tedy zvýšeny hladiny mnoha homeotických genů a aktivovány primární morfogenetické dráhy, které bychom našli v embryu při vývoji kostry a končetin.¹²¹ Právě díky zopakování procesu ontogeneze je postup obnovy kostní tkáně označován jako regenerativní v pravém slova smyslu. Dochází při něm totiž ke vzniku tkáně se stejnými vlastnostmi a buněčným složením jako měla tkáň před poraněním.

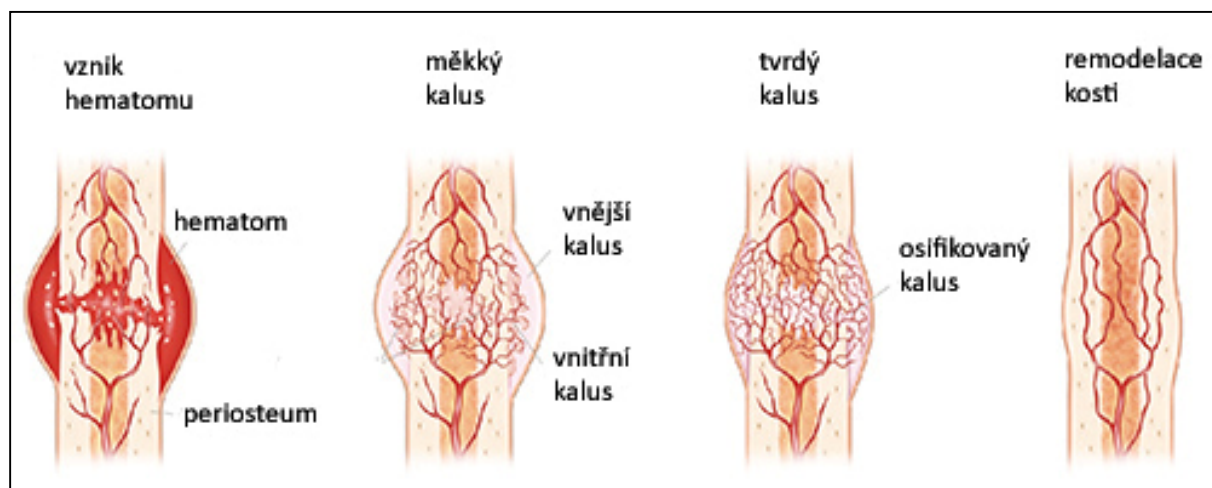
Proces hojení kosti může být primární nebo sekundární. Primární hojení, neboli angiogenní osifikace, je zastoupena pouze raritně. Předpokládá přesnou repozici a naprostý klid v místě zlomu. Buňky prorůstají mezi kostní úlomky, přičemž nedochází ke tvorbě svalku. Při sekundárním hojení, chondrodesmální osifikaci, vzniká nejprve vazivový svalek, který se postupem času mění na lamelární kost.¹²² Celý postup se dá chronologicky rozdělit do následujících fází: vznik hematomu, zánět, angiogeneze, formace chrupavky (a její následná mineralizace a osifikace) a remodelace kosti.¹²³

Hematom se rozvíjí v řádu hodin až dní po úraze jako následek porušení krevních cév v okolí místa poranění. Buňky imunitního systému (makrofágy, monocyty, lymfocyty a polymorfonukleární buňky) jsou do zlomeniny chemotakticky přitahovány prozánětlivými cytokiny IL-1, IL-6 a TNF- α a také je v prvních třech dnech samy produkují.¹²² Prostaglandiny mají stimulační efekt na syntézu ECM a angiogenezi, lákají fibrogenní buňky a v pozdějších stadiích hojení podporují resorpci kosti.⁸⁵ Působení všech výše zmíněných faktorů vede ke vzniku granulační tkáně tvořené především vazivem. V tomto období k hojení jako takovému ještě nedochází. Podávání léčiv tlumících imunitní reakci nebo blokace dráhy cyklooxygenázy 2 může zapříčinit inhibici celé hojící kaskády.¹²³ Mezi další molekuly, které jsou exprimované v prvních dnech poranění patří TGF- β , PDGF – uvolňované z trombinem aktivovaných destiček, a BMP-2. Působením růstových faktorů je indukováno vcestování MSC do zlomeniny a zahájena osteogenní diferenciaci. Přísun živin a kyslíku v těchto brzkých fázích je zajištěn kontaktem se svalovými a nepoškozenými kostními buňkami^{122,124}



Obrázek č. 9: **Buněčná signalizace následující po poškození kosti.** Klíčovou roli v procesech migrace a proliferace buněk po zlomenině hrají růstové faktory PDGF, VEGF a TGF- β . Přitahování osteoprogenitorových buněk do místa defektu poskytuje dostatek buněk reagujících na přítomné biomolekuly. Převzato a upraveno podle ¹²⁵.

Ve chvíli kdy klesne hladina cytokinů, přítomné buňky začnou proliferovat. Jedná se o MSC, preosteoblasty a osteoblasty. Intramembranózní osifikace vrcholí 7. až 10. den a je následována chondrogenézí a osifikací endochondrální pod vlivem růstových faktorů TGF- β .¹²⁴ Na okrajích rány se tak degraduje periosteum a vzniká svalek z vaziva a chrupavky. Zároveň s rozvojem chrupavčité tkáně dochází k formaci nových krevních cév pod vlivem VEGF. I nadále jsou produkovány molekuly TGF- β , k nimž se přidávají BMP a společně vedou k mineralizaci měkkých tkání a resorpci chrupavky. Vzniká spongiózní kost. Osteogeneze probíhá nejvýrazněji do konce třetího týdne, kdy opět stoupá hladina prozánětlivých cytokinů. Následuje remodelace kosti.¹²⁶ Klesá hladina růstových faktorů z rodiny TGF- β , buňky přestávají proliferovat a spongióza je nahrazena kompaktní.¹²³ Remodelace kosti pokračuje po dobu dalších několika měsíců. Adekvátní pevnosti kost dosahuje 3 až 6 měsíců po poranění.



Obrázek č. 10: **Proces hojení zlomeniny.** Poškození endotelu krevních cév vede k výronu krve a formaci hematomu v místě zlomeniny. V místě jsou akumulovány buňky imunitního systému, krevní destičky, osteoklasty a MSC. V další fázi dochází k diferenciaci chrupavky a vazivové tkáně a revaskularizaci. Následně je procesem endochondrální a intramembranózní osifikace chrupavčitá tkáň přeměněna na kost s neorientovanými kolagenovými vlákny. Dočasná kostní tkáň je nahrazena lamelární kostí. Zbývající chrupavčitý kalus je resorbován. Převzato a upraveno podle ¹²⁷.

3 Tkáňové inženýrství

Relativně novou a rychle se rozvíjející vědní oblastí je tkáňové inženýrství propojující mnoho vědeckých oborů. Hlavním cílem tkáňového inženýrství, potažmo regenerativní medicíny je vyvinout alternativní terapii některých typů zdravotních komplikací, kde konvenční postupy nevedou k očekávaným výsledkům. K tomu je využívána znalost přirozených signálních drah, molekul a buněk v kombinaci s vhodně navrženými nosiči (pro nosič je zaužívaný termín „scaffold“, který bude v práci dále používán). Pokud se například nepodaří nalézt vhodného dárce pro transplantaci určitého orgánu, tkáňové inženýrství by v ideálním případě mělo poskytnout variantu v podobě syntetické nebo polosyntetické náhrady (v případě pojivových tkání), případně z vlastních buněk pacienta vypěstovat *in vitro* náhradu organickou a následně ji implantovat, nebo stimulovat buňky pacienta *in vivo* například k diferenciaci a tvorbě tkáně nové a plně funkční.

První pokusy o vývoj syntetické náhrady proběhly v 60. letech 20. století. Jednalo se o arteficiální kožní štěpy určené pro krytí ran po popáleninách.¹²⁸ Kůže byla po dlouhou dobu hlavním zájmem tkáňových inženýrů. V současnosti se škála rozšířila na pojiva (kosti, chrupavky, šlachy), srdeční a jaterní tkáň, krevní cévy, svaly a také nervy.¹²⁹

V současnosti jsou uplatňovány dva základní přístupy. Buněčná terapie, která obnáší aplikaci samotných buněk, nebo tkáňové inženýrství v pravém slova smyslu, které je komplexnější a zahrnuje více synergicky působících faktorů. Využívá různé druhy bioaktivních signálních molekul, rozmanité materiály pro scaffoldy, na něž lze nasadit buňky. Úkolem všech použitých komponent je stimulovat buňky k expanzi a diferenciaci v žádaný buněčný typ a docílit plnohodnotné regenerace poškozené tkáně.⁹²

3.1 Inženýrství kostní tkáně

Incidence různých kostních patologií celosvětově prudce stoupá stejně jako počty lidí s traumatickými zlomeninami. Vzhledem ke stylu života současné společnosti s minimem fyzické aktivity a vysokým procentem obezity se dá očekávat, že tento trend bude i nadále zachován. Terapie kostních defektů s sebou navíc nese poměrně velké finanční náklady.

Klíčovými body kostního tkáňového inženýrství jsou: 1) biokompatibilní scaffoldy, které co nejpřesněji napodobují přirozenou extracelulární matrix, 2) buňky schopné osteogeneze a produkce specifických matrixových proteinů, 3) signální molekuly stimulující buňky k diferenciaci a 4) vaskularizace nově formované tkáně a zajištění přísunu živin.¹³⁰ Při volbě postupu léčby je jedním ze zásadních kritérií rozsah poškození kosti. Například po odstranění nádoru nebo následkem masivního traumatu totiž může překročit tzv. kritickou velikost defektu. Kritická velikost defektu je definována

jako taková, jejíž délka je vyšší než 2,5x poloměr dané kosti. Aby se zabránilo špatnému zhojení s následkem vzniku pakloubu, je nutné do vzniklé mezery vložit implantát. Buňky ho využijí jako lešení, které osídlí a snáze tak překonají štěrbinu mezi kraji rány.¹³¹

3.1.1 Kostní štěpy

Standardním postupem náhrady chybějící tkáně kosti o kritické velikosti jsou kostní štěpy. Štěp může být autologní, alogenní nebo xenogenní. Všechny typy s sebou nesou určité nevýhody.

V případě, že pacient je zároveň i dárce (tedy autologní transplantace) je štěp histokompatibilní a neimunogenní. Nese s sebou rovněž tu výhodu, že sám o sobě obsahuje kostní buňky, které jsou schopné reagovat na signály z okolního mikroprostředí. Nicméně jsou zde nutné dva chirurgické zákroky – jeden pro odběr a jeden následně při implantaci. V porovnání s následujícími dvěma postupy je tedy zvýšená pravděpodobnost pooperačních komplikací jako je například zánět a krvácení. Izolace štěpu je kromě toho spojena s rizikem deformace místa odběru nebo jeho chronickou bolestivostí.^{132,130}

Podstatou alogenní transplantace je doplnění kosti štěpem z mrtvého dárce. Oproti autolognímu štěpu tento terapeutický postup nezahrnuje produkci nových kostních buněk samotným štěpem. Před transplantací totiž štěp projde devitalizací ozářením nebo vysušením mrazem – tzv. lyofilizací.¹³³ Takový štěp tedy bude fungovat spíše jako 3D konstrukce, kterou kolonizují buňky z okolní zdravé tkáně. Při využití kostního štěpu od jiného člověka hrozí riziko přenosu infekce a rozvoje reakce imunitního systému. Navíc je s ním spojena určitá míra prevalence pozdní rejekce.¹³²

Posledním a nejméně využívaným typem je štěp xenogenní, tzn. původem z jiného živočišného druhu, preferenčně se jedná o hovězí dobytek. Kost je vystavena působení teploty přes 500°C, aby došlo k eliminaci všech složek proteinové povahy, které by mohly být příčinou alergické reakce nebo infekce.¹³⁴ Společným negativem alogenního a xenogenního štěpu je prodloužená doba hojení s nižší pravděpodobností úspěchu.¹³⁰

3.1.2 Náhrady štěpů

Vzhledem k možným komplikacím spojeným s transplantací původně organického štěpu je v oblasti inženýrství kostní tkáně snaha vyvinout syntetické náhrady štěpů. Obecně by měl být materiál takové náhrady biokompatibilní, tedy nesmí vyvolávat nežádoucí reakce organismu, mít cytotoxický a karcinogenní efekt nebo ovlivňovat fyziologické pochody v těle.¹³⁵ Kromě biokompatibility jsou důležitými vlastnostmi biomateriálů osteoinduktivita, osteokonduktivita a osteointegrace (někdy také osseointegrace). Osteoinduktivní nosič působí stimulačně na MSC ve smyslu osteogenní diferenciace a podporuje formaci Haversova systému a krevních cév.¹³⁶ Osteokonduktivita je chápána jako vlastnost materiálu umožňující růst přitahovaných buněk na jeho povrchu nebo v pórech. Kondukce kosti není

možná na kovových nosičích vyrobených ze stříbra nebo mědi. Jiné typy kovů, jako například titan, jsou k tomuto účelu velmi vhodné a již v klinické praxi používány.^{137,138} Po osteoindukci a osteokondukcí přichází konečně na řadu přímý kontakt živé kostní tkáně a implantátu, tedy osteointegrace. Histologicky je definována jako ukotvení nosiče v místě rány nově formovanou kostí aniž by na jejich rozhraní byla přítomna fibrotická tkáň.¹³⁷ Je třeba podotknout, že osteokonduktivní a osteoinduktivní scaffoldy nedokáží indukovat vaskularizaci, bez níž regenerace nebude úspěšná. Proto je třeba ji stimulovat jinými způsoby, například přidávkou VEGF.^{139,140} Naprosto zásadním požadavkem na nosič pro aplikaci v inženýrství kostní tkáně je splnění nároků na mechanické vlastnosti materiálu. Míra pevnosti a tuhosti zajišťuje odolnost kosti proti zlomeninám. Je dána charakteristickou kostní architekturou na úrovni nanostruktur a mikrostruktur a jejich interakcemi.¹³⁰ Výrobu univerzální syntetické náhrady komplikuje fakt, že jednotlivé druhy kostí se mezi sebou v rámci mechanických vlastností výrazně liší. Tlaková síla, které odolá kost kompaktní je v rozsahu 100 – 230 MPa, pro spongiózu to je pouze 2 – 12 MPa. Modul pružnosti v tahu, neboli Youngův modul, udávaný v GPa je pro kompaktní kosti rovněž mnohonásobně vyšší než pro spongiózní.⁵⁰ Speciální vlastností, která je nad rámec určitých základních charakteristik biomateriálů, je biodegradabilita. Biodegradabilní materiály jsou v organismu postupně rozkládány především vodným prostředím a v menší míře také enzymatickou činností. Vytvoříme-li z takového polymeru scaffold, bude nějakou dobu fungovat jako lešení pro buňky. V závislosti na konkrétní použité látce se po určitém časovém úseku beze zbytku rozloží.¹⁴¹ Biodegradabilita může být předpokladem pro osteokonduktivitu – nosič se nejprve musí začít rozkládat, aby se jeho povrch stal vhodným pro růst buněk. Materiály, z nichž jsou vyráběny různé druhy tkáňových náhrad a nosičů, lze tedy rozdělit například na *in vivo* stabilní a na ty, které degradují.

Pro správný průběh regenerace obecně jakékoli tkáně je zásadní i přítomnost a působení specifických bioaktivních molekul. Efekty jednotlivých růstových faktorů a dalších bioaktivních látek na osteogenezi MSC byly popsány v předcházejících kapitolách. V tkáňovém inženýrství je snaha tyto biomolekuly kombinovat a využívat v takových koncentracích, kterými by co nejpřesněji rekapitulovaly a v ideálním případě také urychlovaly proces fyziologické kaskády hojení kosti.

3.1.3 Materiály pro kostní tkáňové náhrady a scaffoldy

3.1.3.1 Demineralizovaná kostní matrix (Demineralised Bone Matrix, DBM)

Jako jedna z mála kostních náhrad vzniká úpravou původně organického materiálu, dekalifikací kompaktní kosti. Její základní složkou je kolagen a nekolagenní proteiny. V procesu výroby je zářením a chemicky ošetřena s cílem minimalizovat riziko přenosu infekce a vzniku odmítavé imunitní reakce příjemce. Tímto postupem však nedochází k odstranění všech kostních růstových

faktorů. Některé se stanou dokonce lépe dostupnými pro buňky. DBM je tedy přisuzován vyšší stupeň osteoindukce než je tomu u standardního mineralizovaného alogenního štěpu.^{142,143}

3.1.3.2 Kovy

Využívány jsou především sloučeniny titanu, tantalu a nerezová ocel.¹⁴⁰ Výhodou kovových náhrad je jejich relativně nenákladná výroba. Jsou nízkoimunogenní, vykazují vysokou biokompatibilitu, odolnost proti korozi a mechanickou pevnost, která je vyšší než u samotné kosti. Běžně nejsou porézní.¹⁴² Zkoumány jsou však také náhrady s různými stupni porozity, která by usnadnila interakci buněk s implantátem a jeho integraci do kosti.¹⁴⁴ Vzhledem k výrazné tuhosti nemohou kovové kostní náhrady mechanicky stimulovat buňky a tím je indukovat k proliferaci a diferenciaci. V organismu také obvykle nedegradují, avšak byl popsán materiál obsahující ionty hořčíku, u něhož byla biodegradabilita pozorována.¹⁴⁰

3.1.3.3 Keramiky

Keramiky jsou anorganické soli a oxidy. Hlavní složkou keramických náhrad je fosforečnan vápenatý (kalciumfosfát) jakožto hlavní složka zdravé kosti. Intenzivní výzkum byl zaměřen především na hydroxyapatit HA, β -trikalciumfosfát β -TCP a jejich směsi, které jsou vysoce biokompatibilní.¹⁴⁰ Mohou být přírodního původu například z hovězích kostí a korálů nebo uměle připraveny z anorganických sloučenin za vysokého tlaku a teploty.¹⁴¹ Pro materiály obsahující kalciumfosfát byla doložena osteoinduktivní i osteokonduktivní aktivita.¹³⁰

Mezi keramiky jsou řazena také bioaktivní skla obsahující sloučeniny křemíku, vápníku, sodíku a fosforu. Složky mohou být v různých poměrech, což má vliv na míru resorbovatelnosti skla.¹⁴⁰ Jsou to velmi tvrdé a neporézní materiály s vlastnostmi vhodnými pro růst buněk i osteointegraci.¹⁴²

3.1.3.4 Polymery

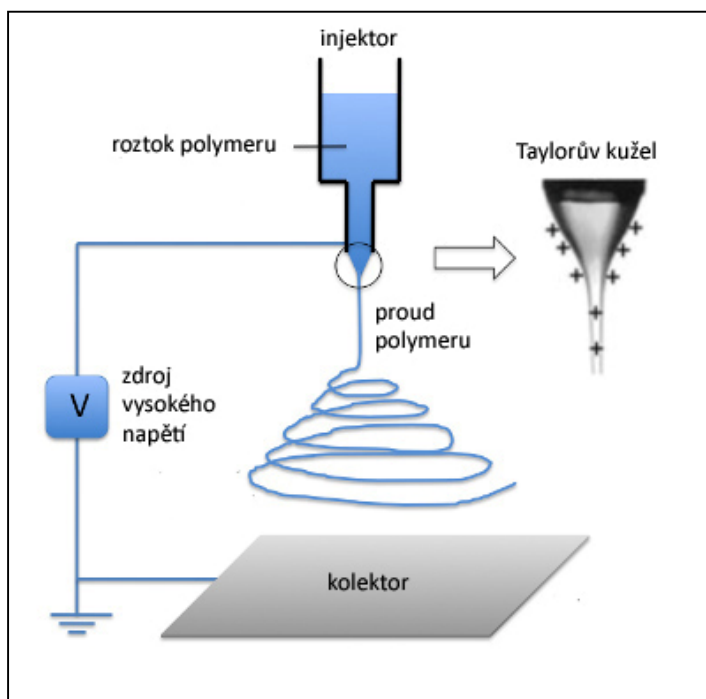
Základní rozdělení polymerů využitelných v kostním tkáňovém inženýrství je na přírodní a syntetické. Z polymerů s přírodním původem se využívají kolagen, fibrin, alginát, hedvábí, kyselina hyaluronová a chitosan. Uměle připravené polymery jsou PLA (kyselina polymléčná), PGA (kyselina polyglykolová), PCL (polykaprolakton) a PEG (polyethylenglykol).¹⁴⁵ Oba druhy polymerů vykazují biodegradabilitu a biokompatibilitu. Je třeba brát v úvahu, že hydrolytickým štěpením některých syntetických sloučenin dochází k okyselení jejich okolí, což může ovlivňovat nově vznikající tkáň.¹⁴⁰ Jednotlivé scaffoldy se liší svými mechanickými vlastnostmi vyplývajícími jednak z rozdílných charakterů konkrétních sloučenin a také z metody výroby nosiče.

Přírodní i syntetické polymery jsou využívány k produkci nanovláknenných nosičů vhodných pro inženýrství kostní tkáně. K jejich výrobě je hojně využívána metoda elektrostatického zvlákňování. Vznikající vlákno lze několika způsoby funkcionalizovat, tedy upravit. Jde například o úpravu povrchu

chemickými a fyzikálními metodami¹⁴⁶ za účelem vylepšení vlastností nosiče pro buňky, nebo inkorporace některých bioaktivních molekul dovnitř vláken.

3.1.3.4.1 Elektrostatické zvlákňování

Metoda využívá tvorbu elektrického pole vysokým napětím na dvou elektrodách, které jsou umístěny naproti sobě - zvlákňovací elektrodě injektoru a na kolektorové elektrodě. Polem v oblasti injikovací jehly prochází roztok polymeru a vzniká tak nabitý proud, v němž se jednotlivé molekuly vzájemně odpuzují. Používaný polymerový roztok musí být dostatečně viskoelastický a mít takové kohezivní vlastnosti, aby vydržel proces zvlákňování. Na špičce jehly, kterou prochází polymer, se formuje Taylorův kužel. V okamžiku kdy napětí mezi injektorem a kolektorem překročí povrchové napětí na Taylorově kuželu, nabitý proud začne být přitahován na kolektor, jenž má opačný náboj. V průběhu cesty se odpařuje rozpouštědlo a na kolektoru vzniká síť více nebo méně uspořádaných pevných nanovláken o průměru desítek nanometrů až mikrometrů.¹⁴⁶ Polymery mohou být rozpuštěny ve vodě a v organických rozpouštědlech, například acetonu a dichlormethanu.¹⁴⁷ Výslednou morfologii vlákna lze ovlivnit použitým polymerem a rozpouštědlem, napětím mezi elektrodami a jejich vzdáleností, rychlostí vstřikování roztoku a koncentrací polymeru v něm.¹⁴⁸



Obrázek č. 11: **Elektrospinning.** Roztok polymeru je nabit a z injektoru je přitahován na opačně nabitý kolektor. Na kolektoru jsou sbírána jednotlivá nanovlákna a tvoří neuspořádanou síť. Převzato a upraveno podle ¹⁴⁹.

3.1.3.5 Biokompozity

V posledních letech je trendem spojovat rozdílné charakteristiky keramik a polymerů a tvořit z nich tzv. biokompozity, které kombinují optimální biologické a fyzikální vlastnosti obojího. Keramiky sice mají výborné osteoinduktivní vlastnosti, nicméně nejsou biodegradabilní a svou strukturou tolik nepodporují formaci kostní architektury jako polymery. Konkrétně jsou kombinovány například kolagen typu I a kalciumfosfáty, kolagen a hydroxyapatit nebo bioskla s PLA.¹⁴¹

3.1.3.6 Hydrogely

Hydrogely jsou tvořeny sítí polymerových řetězců hydrofilní povahy s vysokou absorpční schopností. Jsou velmi pružné a dokáží mimikovat některé fyzikální, chemické a strukturní vlastnosti ECM. Přidáváním specifických nanočástic, jako je například hydroxyapatit, kalciumfosfát nebo uhlíkové nanotrubičky, mohou být některé jejich vlastnosti potenceovány. Pro přídavné nanopartikule byl prokázán efekt podpory buněčné proliferace a stimulace adheze. V některých případech rovněž indukují osteogenezi.¹⁵⁰ Jejich vlastnosti je však předurčují především pro tkáňové inženýrství chrupavky, kde je potřeba velká elasticita a schopnost po deformaci zaujímat původní tvar a strukturu.

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Název	Katalogové číslo	Výrobce
Alizarin Red	A5533+C3:C26	Sigma Aldrich
ALP substrát	N7653	Sigma Aldrich
antibiotika (penicilin/streptomycin)	15140-122	Invitrogen
askorbát	A8960	Sigma Aldrich
β -glycerolfosfát	50020	Sigma Aldrich
BSA	K41-001	PAA
dexamethason	D4902	Sigma Aldrich
DiOC6	52303	Enzo
EDTA	EDS	Sigma Aldrich
ethanol	70390	Penta
FBS	F7524	Sigma Aldrich
formaldehyd	14150	Penta
Hoechst 34580	H21486	Molecular Probes
MEM (Minimal Essential Medium)	51411C	Sigma Aldrich
MTS substrát	G3581	Promega
NaOH	15670	Penta
phalloidin + Alexa Fluor® 633	P1951	Sigma Aldrich
PI	P4864	Sigma Aldrich
Quant-iT™ RNA Assay Kit	Q33140	Invitrogen
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Reagent	Q33120	Invitrogen
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1631	Thermo Scientific
Rneasy Mini Kit	74106	Qiagen
růstové faktory	bFGF: 100-18C TGF- β : 100-21 HGF: 100-39 IGF-1: 350-10 BMP-2: 120-02 VEGF: 100-20	PeproTech
taurin	T8691	Sigma Aldrich
TaqMan® Gene Expression Assay	Coll: 4453320 RunX2: 4448892 EEF-1: 4331182	Life Technologies
TaqMan® Gene Expression Master Mix	4369061	Applied Biosystems
Tris	T1503	Sigma Aldrich
TritonX-100	T8787	Sigma Aldrich
trypsin-EDTA	59418C	Sigma Aldrich

Tabulka č. 1: Používané chemikálie, abecedně seřazené

4.2 Pístroje

Přístroj	Název	Výrobce
analytické váhy	T5939	Kern
centrifuga	NF800R	Nüve
centrifuga	Spectrafuge 24D	Labnet
cycler pro syntézu cDNA	GenePro	BIOER
cycler na RT-PCR	LightCycler 480	Roche
flow box	Safe flow 1.2	Bioair
inkubátor	2424-2	Shel Lab
mikroskop konfokální	LSM 5 DUO	Zeiss
mikroskop světelný	TH4-200	Olympus
NanoDrop	ND1000	Thermo Scientific
pH metr	FE20-BASIC	Mettler Toledo
reader	InfiniteM200PRO	Tecan
třepačka	Rotamax120	Heidolph
vodní lázeň	NB-301	BioTek
vortex	ZXClassic	VELP Scientifica

Tabulka č. 2: Používané přístroje, abecedně seřazené

4.3 Izolace MSC

Mezenchymální kmenové buňky byly izolovány z kostní dřeně lidských dárců. Odběr byl proveden z lopaty kosti kyčelní. Dřeň byla smíchána s gelofusinem v poměru 3:1 a nechala se sedimentovat. Následně byla sebrána vrchní vrstva jaderných buněk, které byly vysazeny do kultivačních lahví. Kultivace probíhala v AlphaMEM s 5% trombocytárním lyzátem a přídavkem gentamicinu v koncentraci 10 µg/ml. MSC byly kultivovány v inkubátoru s 5% atmosférou CO₂ při teplotě 37°C. Odmytí neadherentních buněk (erytrocyty a mononukleární buňky) bylo provedeno 24 až 48 hodin po vysazení.

4.4 Kultivace a pasážování MSC

Buňky byly kultivovány ve 150 cm² kultivačních lahvích v MEM mediu s přídavkem 10% FBS a 1% antibiotik (Penicilin/Streptomycin). Medium bylo měněno za čerstvé jednou za dva až tři dny. Umístěny byly v inkubátoru při 37°C a 5% atmosféře CO₂.

Pasážování probíhalo ve chvíli, kdy buňky dosáhly zhruba 80% konfluence. Z lahve bylo odsáto medium, buňky byly opláchnuty roztokem fosfátového pufru PBS s 0,002% kyselinou ethylendiaminotetraoctovou. Následně byly asi 3 minuty inkubovány v inkubátoru se 2 ml roztoku proteolytického enzymu Trypsinu, jehož činností došlo k disociaci buněk od podkladu. Po uplynutí doby

kultivace byly buňky spláchnuty médiem s obsahem séra. Tím došlo k deaktivaci trypsinu. Buňky byly rozsuspendovány v odpovídajícím množství media a nasazeny do nových kultivačních lahví v poměru 1:3 nebo 1:4.

4.5 Nasazování MSC

Buňky byly nasazeny v 3. pasáži. Buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy počítací komůrky a nasazeny v hustotě 15 000 buněk/cm². Buňky byly kultivovány na plastiku v 96-ti a 24-ti jamkových destičkách a v 48-ti jamkové destičce na sklíčkách. Do jamek na jednotlivých typech destiček byly přidávány následující objemy media: 96-ti jamková destička 250 µl, 48-ti jamková destička 550 µl a 24-ti jamková destička 1 ml. Buňky byly kultivovány v osteogenním mediu, kdy bylo bazální medium obohaceno o 10 mM β-glycerolfosfát, 100 nM dexamethason a 100 µM askorbát-2-fosfát. Po dobu 21 dní trvajících experimentu byly kultivační destičky uloženy v inkubátoru. Medium bylo měněno jednou za dva až tři dny.

V následujících tabulkách č. 3, 4, 5 a 6 jsou uvedeny kombinace a koncentrace růstových faktorů a taurinu, které byly používány v průběhu experimentů. Složení kultivačního media bude stručně připomenuto na začátku každého experimentu.

skupina	složení kultivačního media
1	osteogenní medium (OM)
2	OM + 20 ng/ml HGF
3	OM + 10 ng/ml IGF-1
4	OM + 10 ng/ml TGF-β
5	OM + 10 ng/ml bFGF
6	OM + 1 ng/ml VEGF
7	OM + 10 ng/ml TGF-β + bFGF
8	OM + 1 ng/ml VEGF + 20 ng/ml HGF
9	OM + 1 ng/ml VEGF + 10 ng/ml IGF-1
10	OM + 20 ng/ml HGF + 10 ng/ml IGF-1
11	OM + 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml bFGF + 1 ng/ml VEGF
12	OM + 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml bFGF + 10mM taurin
13	OM + 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml bFGF + 20 ng/ml HGF
14	OM + 10 ng/ml TGF-β + 10 ng/ml bFGF + 10 ng/ml IGF-1
15	OM + 20 ng/ml HGF + 10 ng/ml IGF-1 + 1 ng/ml VEGF

Tabulka č. 3: Kombinace a koncentrace růstových faktorů a taurinu využívané v experimentu číslo 1.

skupina	složení kultivačního media
1	osteogenní medium (OM)
2	OM + 10 mM taurin
3	OM + 10 mM taurin + 10 ng/ml TGF- β
4	OM + 10 mM taurin + 10 ng/ml bFGF
5	OM + 10 mM taurin + 1 ng/ml VEGF
6	OM + 10 mM taurin + 10 ng/ml TGF- β + 20 ng/ml BMP-2*
7	OM + 10 mM taurin + 10 ng/ml bFGF + 20 ng/ml BMP-2*
8	OM + 10 mM taurin + 1 ng/ml VEGF + 20 ng/ml BMP-2*

Tabulka č. 4: Kombinace a koncentrace růstových faktorů a taurinu využívané v experimentu číslo 2. *BMP-2 byl do media přidáván v druhé fázi experimentu, tzn. od 11. do 21. dne.

skupina	složení kultivačního media
1	osteogenní medium (OM)
2	OM + 10 ng/ml TGF- β + 10 ng/ml bFGF
3	OM + 20 mM taurin
4	OM + 20 mM taurin + 20 ng/ml HGF
5	OM + 20 mM taurin + 10 ng/ml bFGF
6	OM + 20 mM taurin + 10 ng/ml IGF-1

Tabulka č. 5: Kombinace a koncentrace růstových faktorů a taurinu využívané v experimentu číslo 3.

skupina	složení kultivačního media
1	osteogenní medium (OM)
2	OM + 10 ng/ml bFGF
3	OM + 10 mM taurin
4	OM + 10 mM taurin + 10 ng/ml bFGF
5	OM + 20 mM taurin
6	OM + 20 mM taurin + 10 ng/ml bFGF

Tabulka č. 6: Kombinace a koncentrace růstových faktorů a taurinu využívané v experimentu číslo 4.

4.6 MTS test

MTS test slouží k měření metabolické aktivity a viability buněk. Hodnocení probíhalo 1., 10., 15. a 21. experimentální den. Buňky v jamkách byly opláchnuty PBS a bylo k nim přidáno 100 μ l kultivačního media s 20 μ l MTS substrátu – tetrazoliové soli ((3-(4,5-demethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Buňky byly se substrátem 60 minut inkubovány v inkubátoru. Během této doby byl původně žlutý MTS substrát metabolizován mitochondriálním enzymem sukcinát dehydrogenázou na nerozpustný formazan fialové barvy. Po inkubaci bylo odebráno 100 μ l roztoku od buněk a byla spektrofotometricky změřena jeho absorbance při 490 nm, kde má formazan absorpční maximum (referenční vlnová délka 690 nm). Použit byl reader infiniteM200PRO, Tecan.

4.7 Kvantifikace obsahu buněčné DNA

Obsah DNA byl kvantifikován 1., 10., 15. a 21. experimentální den. Buňky byly po inkubaci s ALP substrátem 2x opláchnuty PBS a byl k nim přidán lyzační pufr (10mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1 mM EDTA a 0,0004% Triton X-100). Buňky byly v jamkách zamraženy. Po rozmražení byly pipetou setřeny ze dna jamky a celý obsah byl přepipetován do 1,5 ml mikrokumavky. Následovala další dvě zmražení. Po každém rozmražení byly vzorky vortexovány pomocí přístroje ZXClassic, VELP Scientifica. Celkově tedy vzorky prošly třemi cykly zmražení/rozmražení a vortexace.

Do černé 96-ti jamkové destičky s průhledným dnem bylo pipetováno 200 μ l pracovního roztoku Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Reagent a 10 μ l vzorku nebo 10 μ l DNA standardu obsaženého v esejí. Pracovní roztok obsahuje fluorescenčně značenou sondu a po navázání na dvouřetězcovou DNA tak dochází k emisi signálu. Byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 485 nm a emisní 528 nm.

4.8 Měření aktivity alkalické fosfatázy (ALP)

Měření probíhalo 1., 10., 15. a 21. experimentální den. Buňky v jamkách byly po inkubaci s MTS substrátem 2x opláchnuty PBS a byl k nim přidáno 100 μ l substrátu pro ALP (p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System). S ALP substrátem byly buňky inkubovány ve tmě 30 minut při pokojové teplotě. Alkalická fosfatáza katalyzuje přeměnu bezbarvého p-nitrofenylfosfátu na žlutě zbarvený p-nitrofenol. Po uplynutí předepsané doby byl celkový objem z každé jamky přepipetován do nové destičky a bylo přidáno 50 μ l 2 M NaOH. Následně byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 405 nm.

4.9 Detekce mineralizace – Alizarin Red S barvení

Byl připraven 40 mM roztok ARS, neboli 1,2-dihydroxyanthrachinonu v destilované vodě, pH bylo upraveno pomocí NaOH a HCl na 4,1 – 4,3. Bylo odsáto medium a buňky byly opatrně 2x opláchnuty PBS. Následně byly po dobu 15 minut za pokojové teploty fixovány 10% roztokem formaldehydu v PBS. Po fixaci byly 3x opláchnuty destilovanou vodou. Do každé jamky bylo pipetováno dostatečné (tzn. aby bylo pokryto dno) množství barvicího roztoku Alizarinu Red S. Buňky s ním byly inkubovány 30 minut za pokojové teploty a mírného míchání na třepačce. Barvivo se v chelatačním procesu váže na deponované kalcium a další minerální látky, což slouží k detekci mineralizace. Po uplynutí doby inkubace byly buňky 4x promyty destilovanou vodou a snímány optickým mikroskopem při desetinásobném zvětšení.

4.10 Vizualizace buněk – konfokální mikroskopie

Za účelem vizualizace byly buňky nasazeny na sklíčka vložená do jamek. V daný experimentální den bylo odsáto medium, buňky byly 2x opláchnuty PBS a následovala etanolová řada pro fixaci. Nejprve byl přidán 40% etanol, pak 60% a jako poslední 70%, v němž byly buňky ponechány a uskladněny v mrazáku. Působení každého ředění byly buňky vystaveny po dobu minimálně 30 minut.

Po vyjmutí z mrazáku byly vzorky 3x opláchnuty PBS, permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100 a znovu opláchnuty PBS. Barveny byly protilátkou Alexa Fluor® 633 konjugovanou s phalloidinem v poměru 1:50 v PBS s 0,5% BSA, inkubace 90 minut. Dále byl na stejný vzorek použit Hoechst 34580 1:5000 v PBS, inkubace 15 minut. Přídavek BSA má zabránit nespecifické vazbě protilátek na buněčné struktury a redukovat tak šum pozadí. Po obarvení buněčných struktur byly vzorky 3x opláchnuty PBS. Hoechst je fluorescenční barva. V případě phalloidinu se jedná o cyklický peptid s připojenou fluorescenční značkou. Inkubace všech vzorků tak musela probíhat ve tmě.

Phalloidin se váže na filamentární aktin a lze tedy pomocí něho vizualizovat cytoskeletární struktury. DiOC6 barví všechny membránové struktury. Hoechst se váže do malého žlábků buněčné DNA, preferenčně do míst bohatých na thymín a adenin, a vizualizuje tak jádro.

Po uplynutí doby inkubace byly buňky 3x opláchnuty PBS a snímány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 5 DUO při sto- a dvouseťnásobném zvětšení. Alexa Fluor® 633 je excitována při 632 nm a emituje záření o vlnové délce 647 nm. Hoechst 34580 má vlnovou délku excitace 392 nm a emise 440 nm.

4.11 RT-PCR

RNA byla v určené experimentální dny izolována za použití kitu Qiagen RNeasy Mini Kit. V prvním kroku byly vzorky lyzovány a homogenizovány – mechanicky a pomocí pufrů z kitu. Následně byl přidán 70% ethanol z mrazáku s cílem precipitovat RNA. Využity byly zkumavky se silikagelovou membránou, na kterou se RNA váže, zatímco ostatní buněčné struktury jsou odmyty. V závěru je čistá koncentrovaná RNA vymyta vodou. Sadou Quant-iT™ RNA Assay Kit byla změřena koncentrace RNA v jednotlivých vzorcích. Do černé destičky s průhledným dnem bylo pipetováno 200 µl pracovního roztoku a po 10 µl vzorku nebo různě koncentrovaných standardů, které jsou součástí kitu. Pracovní roztok obsahuje sondu, která po interakci s RNA fluoreskuje. Vzorky byly měřeny při excitaci 644 nm a emisi 673 nm pomocí readru. Alternativně byla koncentrace RNA ve vzorcích měřena také na přístroji NanoDrop. Při této metodě je spektrofotometricky měřena absorbance při 260/280 nm a dochází tak ke kvantifikaci množství RNA ve vzorku. Mezi dva optické povrchy je nanесena kapka o objemu 1 µl,

kteřá je pomocí povrchového napětí mezi těmito povrchy stabilizována. Výsledkem je množství RNA ve vzorcích v nanogramech.

Pro syntézu cDNA (komplementární DNA) je využíván RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. K přepsání mRNA vyizolované ze vzorků do cDNA dochází reverzní transkripcí, tedy enzymem reverzní transkriptázou. Je zásadní, aby po celou dobu přípravy byly vzorky chlazeny na ledu.

Analyzovány byly geny pro osteogenní markery RunX2 a Coll a jako „housekeepingový“ neboli referenční byl použit gen EEF-1 (eukaryotický elongační faktor). Referenční gen byl použit k normalizaci hodnot pro geny spřažené s osteogenezí.

Získaná cDNA byla využita k provedení polymerázové řetězové reakce RT-PCR (z angl. Polymerase Chain Reaction). V prvním kroku je denaturační za působení teploty 95°C. Následně je teplota snížena, aby na sekvence, které jsou předmětem našeho zájmu, mohly nasednout primery a DNA polymeráza zahájit syntézu řetězce komplementárního k templátu. To vše za teploty optimální pro funkci dané DNA polymerázy. Celý proces denaturace, nasedání primerů a syntézy komplementárních úseků je opakován v mnoha cyklech. Nárůst počtu nově vzniklých kopií by měl být exponenciální. V procesu detekce množství kopií dané sekvence byly využívány sondy TaqMan s fluorescenční značkou na 5' konci a jejím zhášecem na 3' konci. Sonda je oligonukleotid, který hybridizuje s cílovou sekvencí genu, který nás zajímá. Jak DNA polymeráza postupuje v replikaci, ve chvíli kdy dojde k sondě, rozštěpí ji díky své 5'-nukleázové aktivitě. Tím se fluorescenční značka dostane do takové vzdálenosti od svého zhášече, že jím již není ovlivňována a začne vydávat fluorescenci. Nárůst intenzity fluorescence je úměrný počtu degradovaných sond.

Množství mRNA pro jednotlivé geny bylo relativně kvantifikováno s využitím tzv. housekeeping genů (referenční geny). Pro gen zájmu i pro referenční gen je sledována hodnota Cp. Cp je zkratkou pro anglický výraz crossing point neboli bod přechodu. Velikost Cp vyjadřuje číslo cyklu, ve kterém intenzita fluorescence odštěpených sond přesáhne určitou prahovou hodnotu. Následně je odečtena hodnota Cp referenčního genu od hodnoty Cp cílového genu a dostaneme „ ΔC_p “. Grafy byly vytvořeny z hodnot získaných výpočtem podle vzorce $2^{-\Delta C_p}$.

Mezi jednotlivými kroky – izolací RNA, syntézy cDNA a RT-PCR, byly vzorky uchovávány v mrazáku při -80°C. K měření intenzity fluorescence byl využíván Light Cycler 480 (Roche).

4.12 Statistické vyhodnocení dat

Získaná data z MTS testu, aktivity alkalické fosfatázy a kvantifikace buněčné DNA byla statisticky vyhodnocena v programu SigmaStat metodou One Way Analysis of Variance (ANOVA) a Student-Newman-Keuls testem s hodnotou signifikance menší než 0,001 (značeno číslem

s hvězdičkou) a 0,05 (značeno číslem). Číslo v popisku grafu značí vzhledem ke které skupině je daný výsledek signifikantně vyšší.

5 Výsledky

5.1 Růstové faktory

5.1.1 Experiment číslo 1

V průběhu experimentu číslo 1 byly buňky kultivovány na plastiku po dobu 21 dní v osteogenním mediu skládajícím se z MEM, 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin, 10 mM β -glycerol fosfátu, 100nM dexamethasonu a 100 μ M askorbátu. Jednotlivé skupiny se od sebe lišily přidavky dalších suplementů podle následujícího schématu:

skupina 1 ... osteogenní medium (OM)

skupina 2 ... OM + HGF

skupina 3 ... OM + IGF-1

skupina 4 ... OM + TGF- β

skupina 5 ... OM + bFGF

skupina 6 ... OM + VEGF

skupina 7 ... OM + TGF- β + bFGF

skupina 8 ... OM + VEGF + HGF

skupina 9 ... OM + VEGF + IGF-1

skupina 10 ... OM + HGF + IGF-1

skupina 11 ... OM + TGF- β + bFGF + VEGF

skupina 12 ... OM + TGF- β + bFGF + taurin

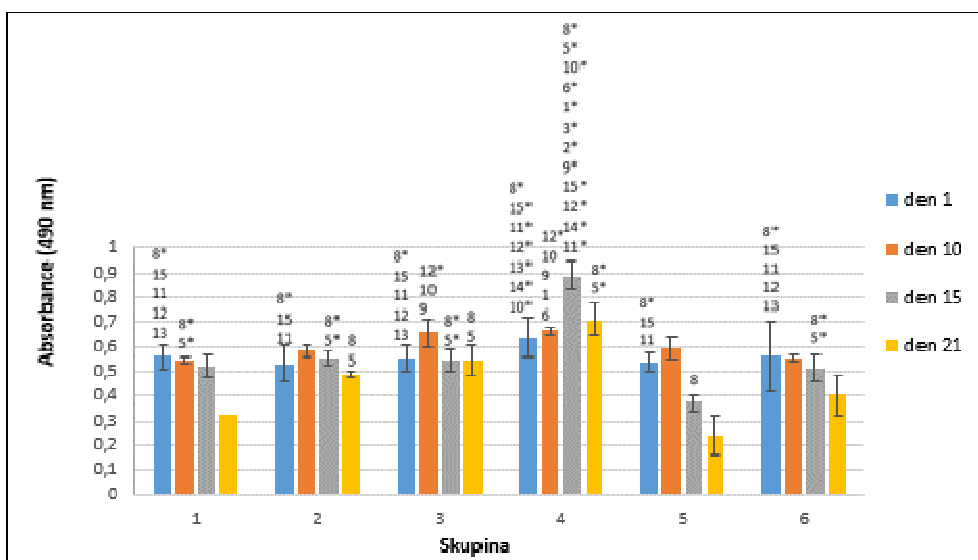
skupina 13 ... OM + TGF- β + bFGF + HGF

skupina 14 ... OM + TGF- β + bFGF + IGF-1

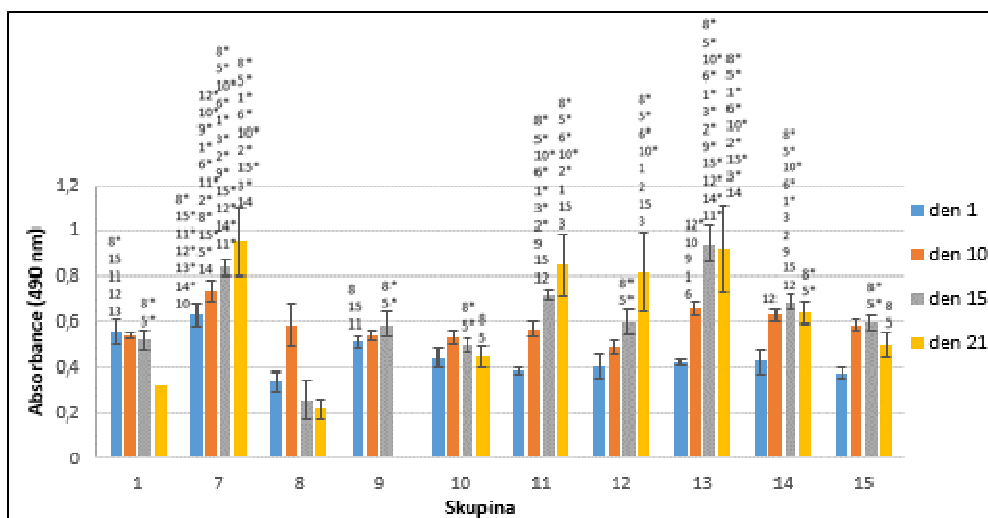
skupina 15 ... OM + HGF + IGF-1 + VEGF

Pro větší přehlednost dat byly skupiny do grafů rozděleny na základě počtu suplementů obsažených v osteogenním mediu. Značení statisticky významných rozdílů se pro oba grafy prolíná. Samostatně jsou tedy znázorněny skupiny 2 – 6, do kterých byl přidáván jeden růstový faktor. Skupiny 7 – 15 obsahovaly kombinaci dvou nebo tří bioaktivních látek. V každém grafu je uvedena také skupina 1 (osteogenní medium), která slouží jako kontrola.

5.1.1.1 MTS test



Graf č. 1a: Metabolická aktivita buněk hodnocená MTS testem v experimentu číslo 1. Naměřené hodnoty absorbance při 490 nm. Skupiny 2 – 6 (z celkem 15) s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1. Číslo v popisku sloupců značí vzhledem ke kterým skupinám bylo v dané skupině dosaženo signifikantně vyšších hodnot. $P < 0,05$ značeno číslem skupiny, $P < 0,001$ značeno číslem skupiny s hvězdičkou.



Graf č. 1b: Metabolická aktivita buněk hodnocená MTS testem v experimentu číslo 1. Naměřené hodnoty absorbance při 490 nm. Skupiny 7 – 15 (z celkem 15) s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafů č. 1a a č. 1b je patrné, že první experimentální den (první den po nasazení) nejvyšší metabolické aktivity dosahovaly buňky ve skupinách 4 a 7. Metabolická aktivita skupiny 4 kultivované v OM s přidavkem TGF- β byla signifikantně vyšší než ve skupinách 8, 10, 11, 12, 13, 14 a 15. Buňky ve skupině 7 byly vystaveny působení TGF- β a bFGF v osteogenním mediu a jejich metabolická aktivita byla rovněž signifikantně vyšší než ve skupinách 8, 10, 11, 12, 13, 14 a 15. První experimentální den

byla nejnižší metabolická aktivita naměřena ve skupinách 8, 10 a 15. V průběhu 21 dní trvajících experimentu docházelo ke zvyšování metabolické aktivity ve skupinách 7, 9, 11, 12 a 13. Po celou dobu prakticky beze změny zůstávala ve skupinách 2, 3 a 10. Sestupný trend byl zaznamenán u skupin 1, 5, 6 a 8, kdy hodnota v 21. dnu byla nižší než hodnota v 1. dnu kultivace. Poslední, tzn. 21., experimentální den vykazovaly nejvyšší metabolickou aktivitu buňky ve skupinách 7, 11 a 13. Ve skupině 7 ovlivněné TGF- β a bFGF v OM byly naměřeny statisticky významně vyšší hodnoty než ve skupinách 1 (kontrola), 2, 3, 5, 6, 8, 10, 14 a 15. Hodnoty skupiny 11 kultivované v TGF- β , bFGF a VEGF v osteogenním mediu byly signifikantně vyšší než ve skupinách 1 (kontrola), 2, 3, 5, 6, 8, 10 a 15. Metabolická aktivita ve skupině 13 ovlivněné kombinací TGF- β , bFGF a HGF v osteogenním mediu byla signifikantně vyšší než ve skupinách 1 (kontrola), 2, 3, 5, 6, 8, 10, 14 a 15. Nejnižší metabolická aktivita byla 21. den naměřena ve skupinách 5 (bFGF + OM) a 8 (VEGF + HGF + OM). Absolutně nejvyšší absorbance bylo dosaženo ve skupině 7 s přidavky TGF- β a bFGF v osteogenním mediu poslední experimentální den.

Ve skupinách, kde docházelo ke zvyšování absorbance a tedy metabolické aktivity, byl tento proces plynulý. Nebyl naměřen žádný výrazný skok. Stejně tak pokles probíhal pozvolně. Ve skupině 9 chybí v tomto experimentu data pro 21. den, protože v ní byla přítomna kontaminace.

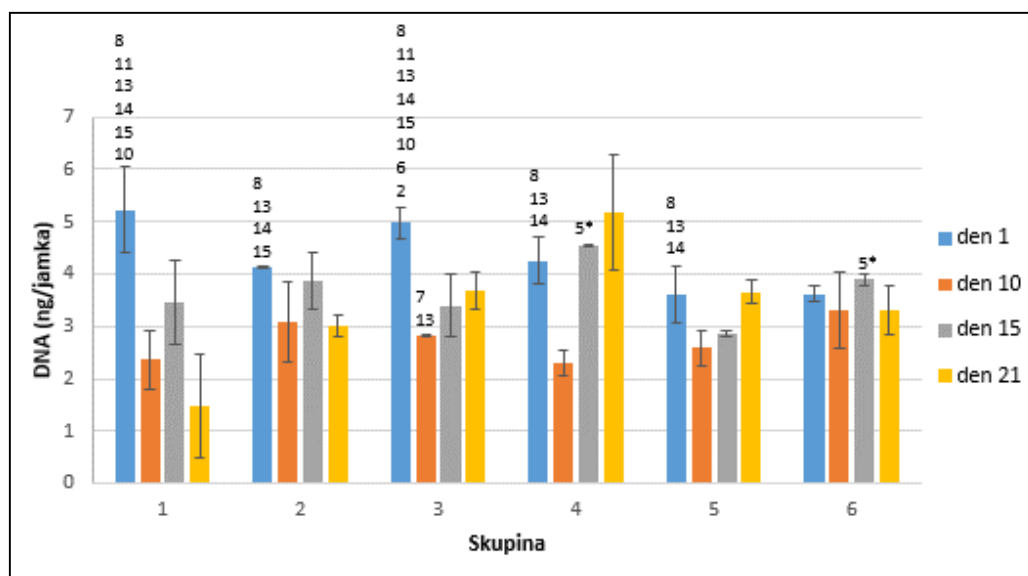
Vzhledem k velkému počtu experimentálních skupin, byla data shrnuta také do tabulek s cílem usnadnit jejich charakterizaci. Porovnáme-li buněčný metabolismus 21. experimentální den ve skupinách ovlivněných samotným růstovým faktorem a ve skupinách s tím samým růstovým faktorem v kombinaci s dalšími bioaktivními molekulami, dostaneme následující tabulku č. 7.

HGF (sk. 2)	+ VEGF (sk. 8)	+ IGF-1 (sk. 15)	bFGF (sk. 5)	+ TGF- β (sk. 7)	+ VEGF (sk. 11)						
	+ IGF-1 (sk. 10)	+ VEGF (sk. 15)			+ Tau (sk. 12)						
	+ TGF- β + bFGF (sk. 13)				+ HGF (sk. 13)						
	+ IGF-1 + VEGF (sk. 15)				+ IGF-1 (sk. 14)						
IGF-1 (sk. 3)	+ VEGF (sk. 9)	+ HGF (sk. 15)		+ TGF- β + VEGF (sk. 11)							
	+ HGF (sk. 10)	+ VEGF (sk. 15)		+ TGF- β + Tau (sk. 12)							
	+ TGF- β + bFGF (sk. 14)			+ TGF- β + HGF (sk. 13)							
	+ HGF + VEGF (sk. 15)			+ TGF- β + IGF-1 (sk. 14)							
TGF- β (sk. 4)	+ bFGF (sk. 7)	+ VEGF (sk. 11)	VEGF (sk. 6)	+ HGF (sk. 8)	+ IGF-1 (sk. 15)						
		+ Tau (sk. 12)		+ IGF-1 (sk. 9)	+ HGF (sk. 15)						
		+ HGF (sk. 13)		+ TGF- β + bFGF (sk. 11)							
		+ IGF-1 (sk. 14)		+ HGF + IGF-1 (sk. 15)							
	+ bFGF + VEGF (sk. 11)		<table><tr><td>snížení metabolické aktivity</td><td>P < 0,001</td><td>P < 0,05</td></tr><tr><td>zvýšení metabolické aktivity</td><td>P < 0,001</td><td>P < 0,05</td></tr></table>			snížení metabolické aktivity	P < 0,001	P < 0,05	zvýšení metabolické aktivity	P < 0,001	P < 0,05
	snížení metabolické aktivity	P < 0,001				P < 0,05					
	zvýšení metabolické aktivity	P < 0,001				P < 0,05					
+ bFGF + Tau (sk. 12)											
+ bFGF + HGF (sk. 13)											
+ bFGF + IGF-1 (sk. 14)											

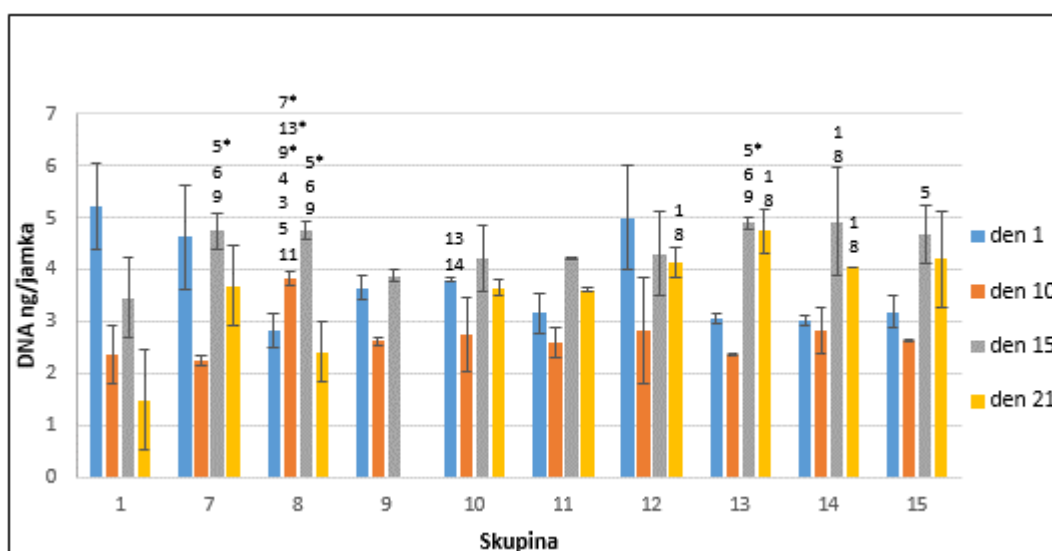
Tabulka č. 7: Vliv růstových faktorů na metabolickou aktivitu MSC. Porovnání efektu samotného růstového faktoru s efektem stejného růstového faktoru v kombinaci s dalšími bioaktivními molekulami na danou experimentální skupinu. Orientace v tabulce: Barva daného pole charakterizuje, jestli došlo k růstu nebo poklesu buněčného metabolismu v porovnání se skupinou ve sloupci vlevo. Pokud je pole bílé, nebyl zaznamenán

statisticky významný rozdíl. Například: 1) Oproti samotnému HGF přídavek VEGF snížil metabolickou aktivitu buněk v dané skupině. Pokud porovnáme skupinu kultivovanou s HGF + VEGF se skupinou kultivovanou s HGF + VEGF + IGF-1, došlo následkem přídavku IGF-1 naopak ke zvýšení úrovně metabolismu. 2) Pokud byl spolu s HGF do media přidáván také IGF-1, nebyl zaznamenán signifikantní růst ani pokles metabolické aktivity v porovnání se skupinou ovlivněnou pouze HGF. Stejně tak nedošlo k významnému růstu ani poklesu hodnot, porovnáme-li vliv HGF + IGF-1 s vlivem HGF + IGF-1 + VEGF.

5.1.1.2 Kvantifikace obsahu buněčné DNA



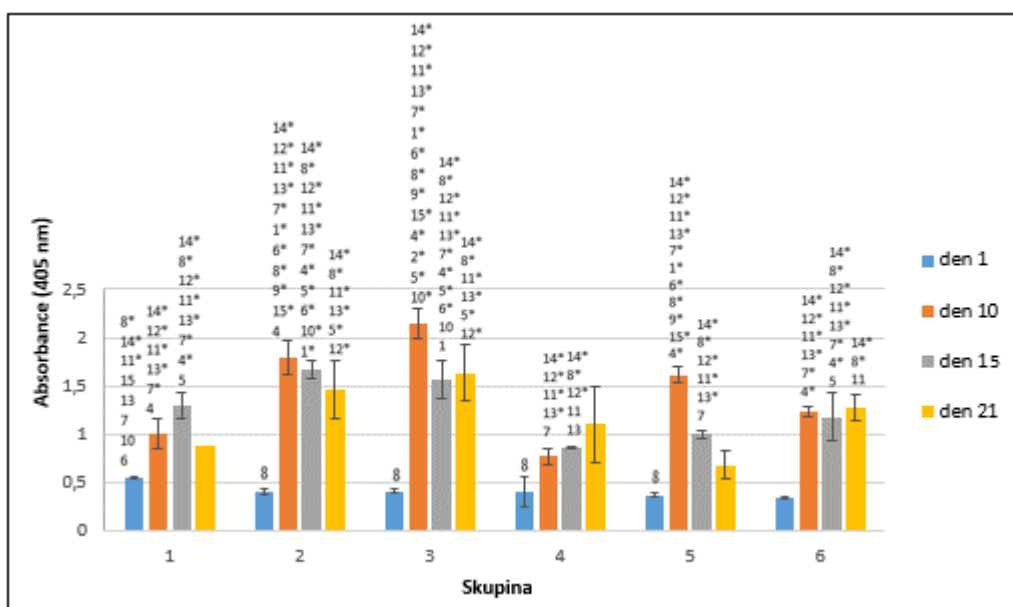
Graf č. 2a: Kvantifikace obsahu buněčné DNA v jedné jamce 96-ti jamkové destičky v experimentu číslo 1. Skupiny 1 – 6 (z celkem 15) s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.



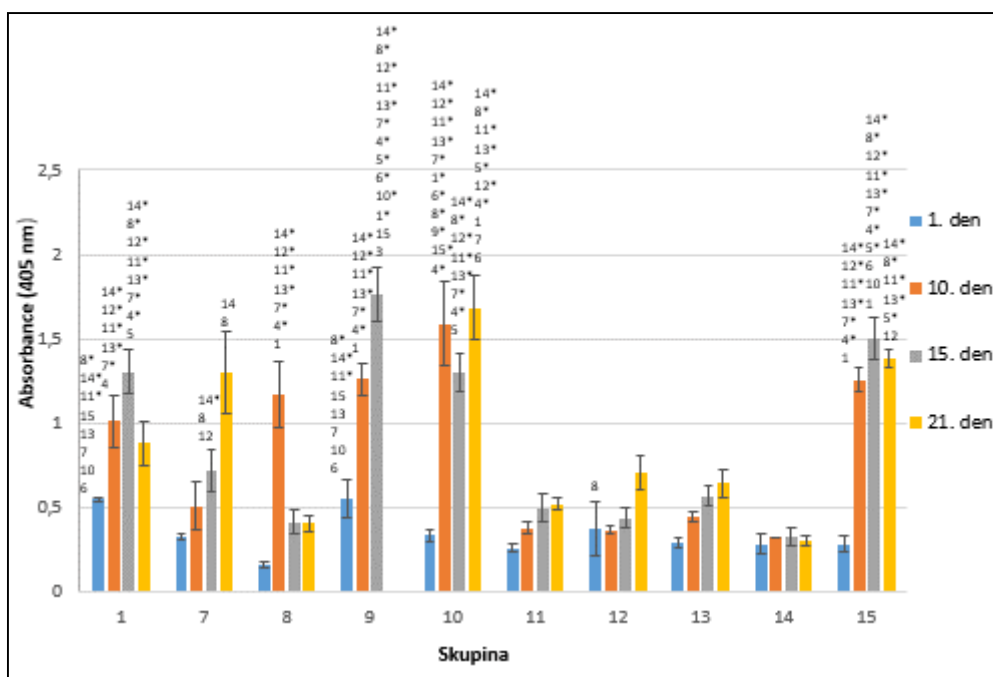
Graf č. 2b: Kvantifikace obsahu buněčné DNA v jedné jamce v experimentu číslo 1. Skupiny 7 - 15 (z celkem 15) s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafů č. 2a a č. 2b vyplývá, že množství DNA se mezi jednotlivými skupinami první den liší. Nejvíce buněčné DNA bylo přítomno ve skupinách 1 (kontrola) s osteogenním médiem a 3 s IGF-1 v osteogenním médiu. Ve skupině 1 bylo naměřeno signifikantně více DNA než ve skupinách 8, 10, 11, 13, 14 a 15. Skupina 3 vykazovala statisticky významné rozdíly v porovnání se skupinami 2, 6, 8, 10, 11, 13, 14 a 15. K trvalému růstu množství buněčné DNA nedošlo v žádné ze skupin. Ve všech skupinách, kromě skupiny 8, byl naopak naměřen pokles mezi 1. a 10. dnem experimentu. Po tomto poklesu byl zaznamenán růst hodnot, který byl ve skupinách 1, 2, 6, 7, 10, 11, 14 a 15 následován jejich opětovným poklesem v 21. dnu. U skupin 3, 4 a 5 se sice hmotnost DNA snížila mezi 1. a 10. dnem, ale od 10. do 21. dne byl naměřen vzestupný trend. Ve skupinách 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 a 12 bylo množství DNA naměřené poslední den experimentu nižší než den po nasazení. Nejnižších hodnot bylo dosaženo ve skupinách 1 a 8, průměrně 1,946 ng DNA na jamku. Nicméně se směrodatnou odchylkou rovnou 0,844. Obecně lze u uvedených dat získaných touto metodou pozorovat velké směrodatné odchylky, což je způsobeno širokým rozptylem následně průměrovaných hodnot.

5.1.1.3 Aktivita ALP



Graf č. 3a: Aktivita alkalické fosfatázy buněk v experimentu číslo 1. Naměřené hodnoty absorbance při 405 nm. Skupiny 2 – 6 (z celkem 15) s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.



Graf č. 3b: Aktivita alkalické fosfatázy buněk v experimentu číslo 1. Naměřené hodnoty absorbance při 405 nm. Skupiny 7- 15 (z celkem 15) s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Jak lze vidět v grafech č. 3a a č. 3b první den po nasazení buněk byla úroveň aktivity alkalické fosfatázy vyšší ve skupinách 1 (kontrola) a 9. Kontrolní skupina kultivovaná v osteogenním mediu i skupina 9 (OM + VEGF + IGF-1) vykazovaly signifikantně vyšší aktivitu ALP než skupiny 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 a 15. V ostatních skupinách, kromě skupiny 8, byla 1. den naměřená absorbance srovnatelná. Ve skupině 8 byla naměřena nejnižší absorbance. Průběžný růst aktivity ALP byl během tří týdnů zaznamenán ve skupinách 4, 7, 9, 11 a 13. Přičemž maximální hodnota skupiny 13 dosahuje asi 50% maximální hodnoty skupiny 7. Ve skupinách 6, 10 a 15 aktivita vzrostla mezi 1. a 10. dnem a pak zůstávala na stejné úrovni. Ke skokovému navýšení aktivity ALP došlo ve skupinách 2, 3, 5, 6, 8, 10 a 15 mezi 1. a 10. experimentálním dnem. Absorbance zůstala po celou dobu experimentu neměnná u skupiny číslo 14. Snížení naměřených hodnot absorbance značí, že v daných skupinách bylo dosaženo maxima aktivity ALP. Lze to vidět ve skupinách 1 (kontrola), 2, 3, 5 a 8, kde k poklesu došlo mezi 10. a 15. dnem. Poslední experimentální den byla pozorovatelná nejvyšší absorbance ve skupinách 2, 3, 10 a 15. Skupina 2 ovlivněná HGF v osteogenním mediu vykazovala signifikantně vyšší hladinu aktivity než skupiny 5, 8, 11, 12, 13 a 14. Stejně tomu bylo ve skupině 3 s přidavkem IGF-1 v OM. Ve skupině 10 s růstovými faktory HGF a IGF-1 v OM byl zaznamenán statisticky významný rozdíl vzhledem ke skupinám 1 (kontrola), 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 a 14. Buňky ve skupině 15 měly signifikantně vyšší aktivitu ALP než ve skupinách 5, 8, 11, 12, 13 a 14. Nejnižší absorbance byla 21. den naměřena pro skupinu 14 obsahující TGF- β , bFGF a IGF-1 v osteogenním mediu. Skupiny 11, 12, 13 a 14 po celou dobu trvání

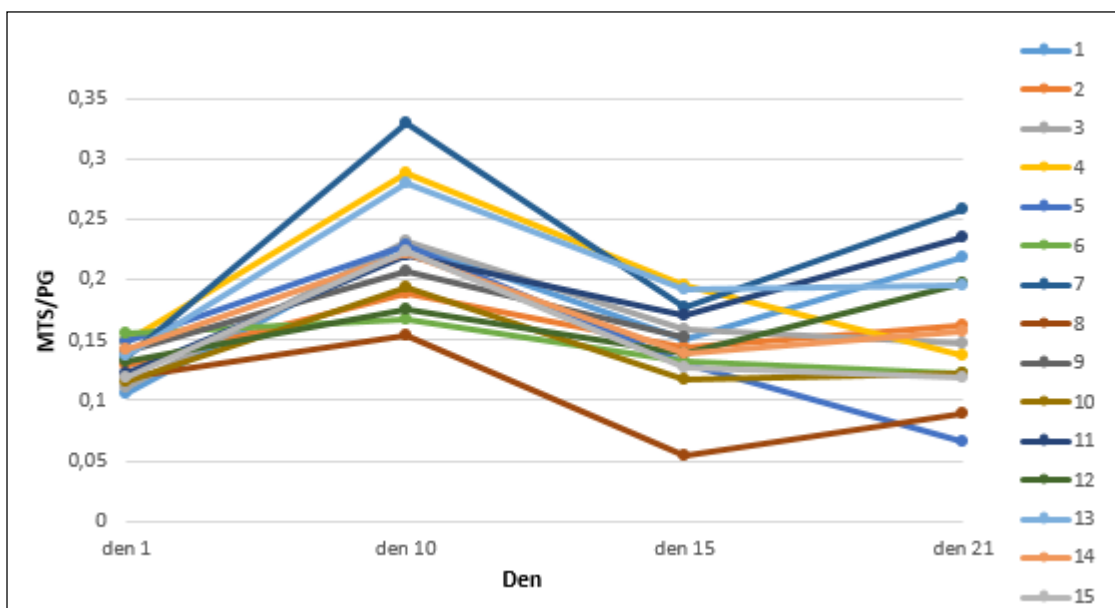
experimentu vykazovaly velmi nízké hodnoty absorbance, které se výrazně nezvyšovaly a průměr jejich dosažených maxim je $0,543 \pm 0,179$. Oproti tomu průměr maxim absorbance skupin s nejvyššími hodnotami je $1,542 \pm 0,142$, což je téměř trojnásobek průměru nejnižších hodnot. Nejvyšší absorbance bylo dosaženo 10. experimentální den ve skupině 3 a to 2,151.

V následující tabulce č. 8 je obdobným způsobem jako v tabulce č. 3 znázorněno porovnání efektu samotného růstového faktoru s efektem stejného růstového faktoru a dalších bioaktivních látek. Opět byla použita data z 21. experimentálního dne.

HGF (sk. 2)	+ VEGF (sk. 8)	+ IGF-1 (sk. 15)	bFGF (sk. 5)	+ TGF-β (sk. 7)	+ VEGF (sk. 11)						
	+ IGF-1 (sk. 10)	+ VEGF (sk. 15)			+ Tau (sk. 12)						
	+ TGF-β + bFGF (sk. 13)				+ HGF (sk. 13)						
	+ IGF-1 + VEGF (sk. 15)				+ IGF-1 (sk. 14)						
IGF-1 (sk. 3)	+ VEGF (sk. 9)	+ HGF (sk. 15)		+ TGF-β + VEGF (sk. 11)							
	+ HGF (sk. 10)	+ VEGF (sk. 15)		+ TGF-β + Tau (sk. 12)							
	+ TGF-β + bFGF (sk. 14)			+ TGF-β + HGF (13)							
	+ HGF + VEGF (sk. 15)			+ TGF-β + IGF-1 (sk. 14)							
TGF-β (sk. 4)	+ bFGF (sk. 7)	+ VEGF (sk. 11)	VEGF (sk. 6)	+ HGF (sk. 8)	+ IGF-1 (15)						
		+ Tau (sk. 12)		+ IGF-1 (9)	+ HGF (sk. 15)						
		+ HGF (sk. 13)		+ TGF-β + bFGF (sk. 11)							
		+ IGF-1 (sk. 14)		+ HGF + IGF-1 (sk. 15)							
	+ bFGF + VEGF (sk. 11)		<table><tr><td>snížení aktivity ALP</td><td>P < 0,001</td><td>P < 0,05</td></tr><tr><td>zvýšení aktivity ALP</td><td>P < 0,001</td><td>P < 0,05</td></tr></table>			snížení aktivity ALP	P < 0,001	P < 0,05	zvýšení aktivity ALP	P < 0,001	P < 0,05
	snížení aktivity ALP	P < 0,001				P < 0,05					
	zvýšení aktivity ALP	P < 0,001				P < 0,05					
	+ bFGF + Tau (sk. 12)										
+ bFGF + HGF (sk. 13)											
+ bFGF + IGF-1 (sk. 14)											

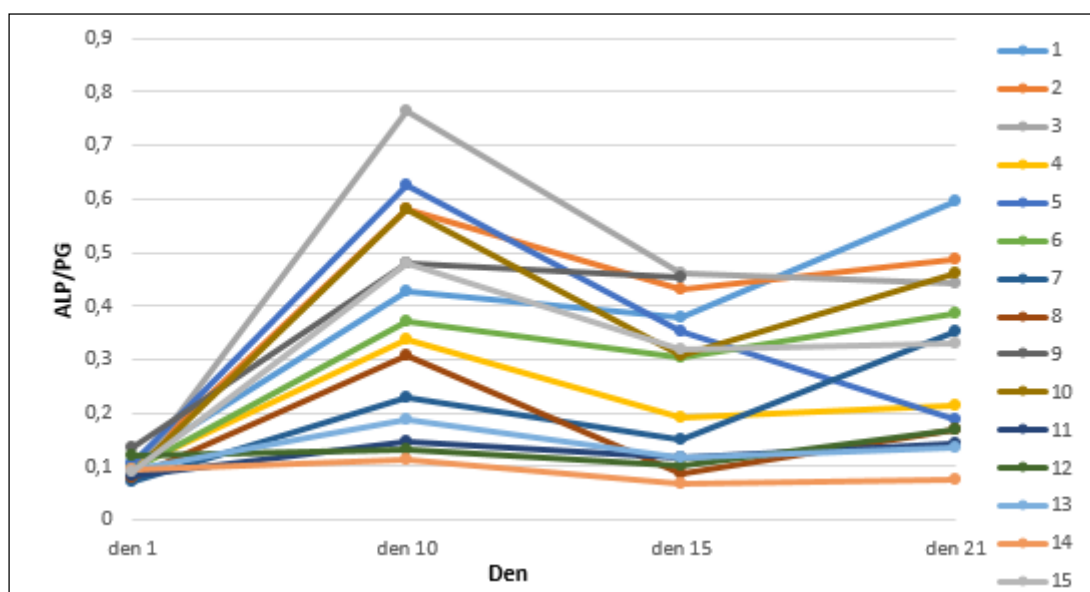
Tabulka č. 8: Vliv růstových faktorů na aktivitu alkalické fosfatázy. Porovnání efektu samotného růstového faktoru s efektem stejného růstového faktoru v kombinaci s dalšími bioaktivními molekulami na danou experimentální skupinu. Orientace v tabulce: Barva daného pole charakterizuje, jestli došlo k růstu nebo poklesu aktivity alkalické fosfatázy v porovnání se skupinou ve sloupci vlevo. Pokud je pole bílé, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Například: 1) Oproti samotnému HGF přidavek VEGF snížil aktivitu ALP v dané skupině. Pokud porovnáme skupinu kultivovanou s HGF + VEGF se skupinou kultivovanou s HGF + VEGF + IGF-1, došlo následkem přidavku IGF-1 naopak ke zvýšení úrovně aktivity ALP. 2) Pokud byl spolu s HGF do media přidáván také IGF-1, byl zaznamenán signifikantní pokles aktivity alkalické fosfatázy v porovnání se skupinou ovlivněnou pouze HGF. Porovnáme-li vliv HGF + IGF-1 s vlivem HGF + IGF-1 + VEGF na aktivitu ALP, bylo pozorováno zvyšování aktivity ALP. Porovnávány byly hodnoty naměřené 15. den, kdy má ALP dosahovat vrcholu své aktivity.

5.1.1.4 Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku



Graf č. 4: Metabolická aktivita přepočítaná na jednu buňku pomocí poměru absorbance při 490 nm ku hmotnosti buněčné DNA v experimentu číslo 1. Skupiny 2 – 15 s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafu č. 4 vyplývá, že metabolická aktivita jedné buňky byla v jednotlivých skupinách první experimentální den v rozmezí 0,1 – 0,15. Od 1. do 10. dne ve všech skupinách stoupala. Nejmírnější nárůst je patrný ve skupině číslo 6. Nejstrměji naopak vzrostla ve skupině 7. V 15. dnu byl ve všech skupinách zaznamenán pokles, který ve skupinách 3, 5, 12 a 14 trval až do 21. dne. U ostatních skupin křivky od 15. dne rostou. Metabolicky neaktivnější byly buňky ve skupině číslo 7 10. experimentální den (s hodnotou 0,337). Nejnížší metabolické aktivity 0,056 dosáhly buňky 15. den ve skupině 8.



Graf č. 5: Úroveň aktivity alkalické fosfatázy přepočítaná na jednu buňku vydělením absorbance při 405 nm hmotností buněčné DNA v experimentu číslo 1. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.

Graf č. 5 ukazuje, že aktivita ALP pro jednu buňku byla 1. den ve všech skupinách kolem 0,1. Mezi dny 1 a 10 je vidět různá intenzita zvyšování aktivity ve všech skupinách. Nejvyšší hodnoty dosahuje 10. den skupina 3 ovlivněná IGF-1 v OM. Nejnižší naopak skupina 14 s kombinací TGF- β + bFGF + IGF-1 v OM. Ve skupinách 12, 13 a 14 je po celou dobu experimentu vidět téměř stejná úroveň aktivity ALP držící se kolem 0,1. Po zvýšení aktivity zaznamenané 10. den došlo 15. den k poklesu, který byl ve skupinách 1, 2, 6, 7 a 10 následován opětovným zvýšením. Nejvyšší aktivita ALP byla 21. den v buňkách v kontrolní skupině 1.

5.1.2 Experiment číslo 2

V průběhu experimentu číslo 2 byly buňky po dobu 21 dní kultivovány na plastiku v osteogenním mediu skládajícím se z MEM, 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin, 10 mM β -glycerol fosfátu, 100nM dexamethasonu a 100 μ M askorbátu. Jednotlivé skupiny se od sebe lišily přidavky dalších suplementů podle následujícího schématu:

skupina 1... osteogenní medium

skupina 2 ... OM + taurin

skupina 3 ... OM + taurin + TGF- β

skupina 4 ... OM + taurin + bFGF

skupina 5 ... OM + taurin + VEGF

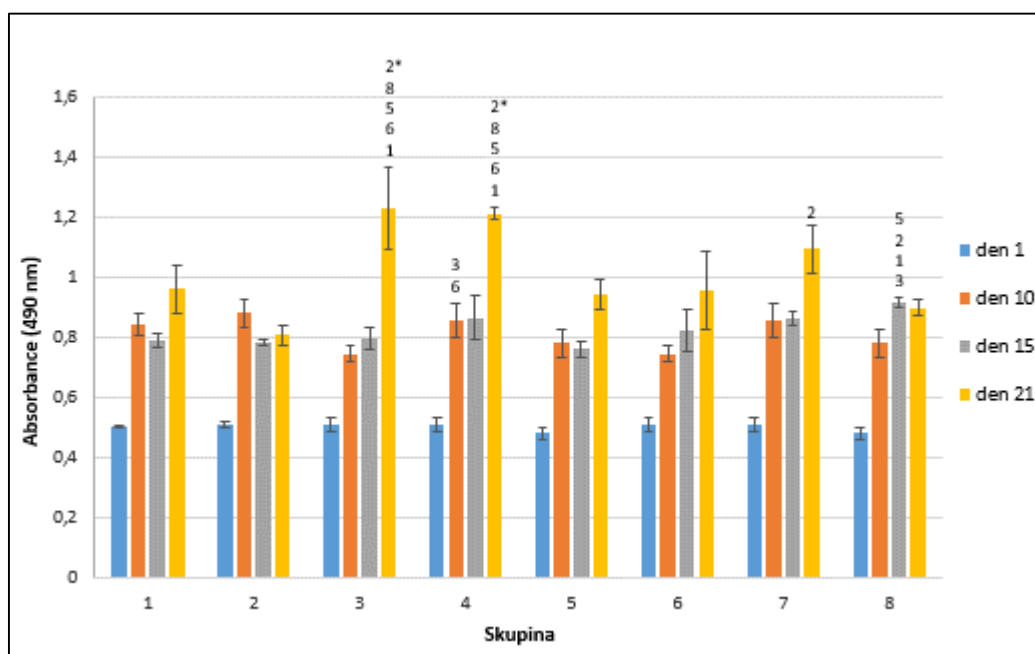
skupina 6 ... OM + taurin + TGF- β + BMP-2*

skupina 7 ... OM + taurin + bFGF + BMP-2*

skupina 8 ... OM + taurin + VEGF + BMP-2*

BMP-2 byl k buňkám přidáván v druhé fázi kultivace (den 11. – 21.)

5.1.2.1 MTS test

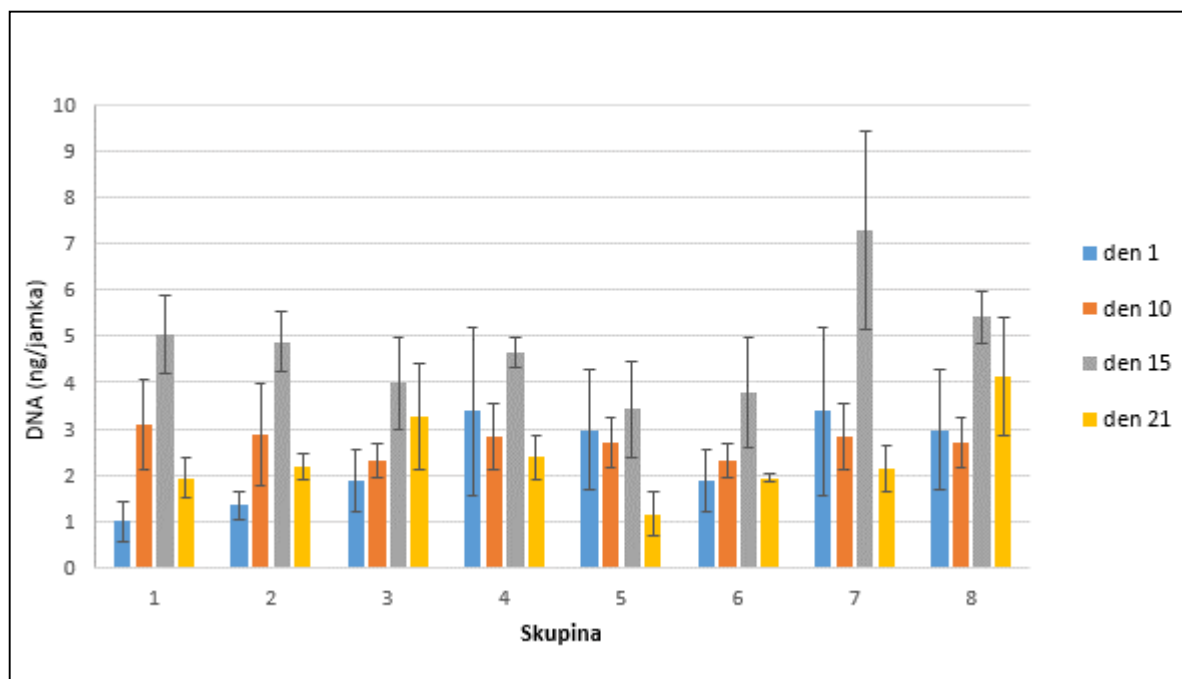


Graf č. 6: Metabolická aktivita buněk hodnocená MTS testem v experimentu číslo 2. Naměřené hodnoty absorbance při 490 nm. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Graf č. 6 ukazuje, že první den experimentu byla metabolická aktivita buněk ve všech skupinách na stejné úrovni. Rovněž ve všech skupinách mezi 1. a 10. dnem rostla. Se statisticky významným rozdílem to bylo pouze ve skupině 4 obsahující taurin a bFGF v OM a to vzhledem ke skupinám 3 a 6. Úroveň metabolismu buněk během celých tří týdnů rostla ve skupinách 3, 4, 6 a 7. Ve skupinách 1, 2 a 5 došlo ke snížení metabolické aktivity 15. experimentální den oproti 10. dnu. V porovnání se skupinami 1, 2, 3 a 5 byla metabolická aktivita 15. den signifikantně vyšší pouze ve skupině 8, která byla v první fázi kultivace (den 1 – den 10) vystavena působení taurinu a VEGF v OM a ve druhé fázi experimentu byl přidáván taurin, VEGF a BMP-2 v OM. Ve skupině 8 metabolická aktivita během 15 dní trvání experimentu rostla, 21. den byl zaznamenán mírný pokles. Poslední experimentální den byla naměřena nejvyšší absorbance $1,219 \pm 0,087$ ve skupinách 3 a 4. Skupina 3 s přísadky taurinu + TGF- β v osteogenním mediu i skupina 4 ovlivněná taurinem a bFGF v osteogenním mediu vykazovaly signifikantně vyšší metabolismus než skupiny 1, 2, 5, 6 a 8. V těchto skupinách došlo k navýšení metabolické aktivity mezi 1. a 21. dnem více než dvojnásobně.

V tomto experimentu bylo nejvyšší úroveň buněčného metabolismu dosaženo ve skupině 3 obsahující OM + taurin + TGF- β a ve skupině 4 s OM obohaceným o taurin a bFGF.

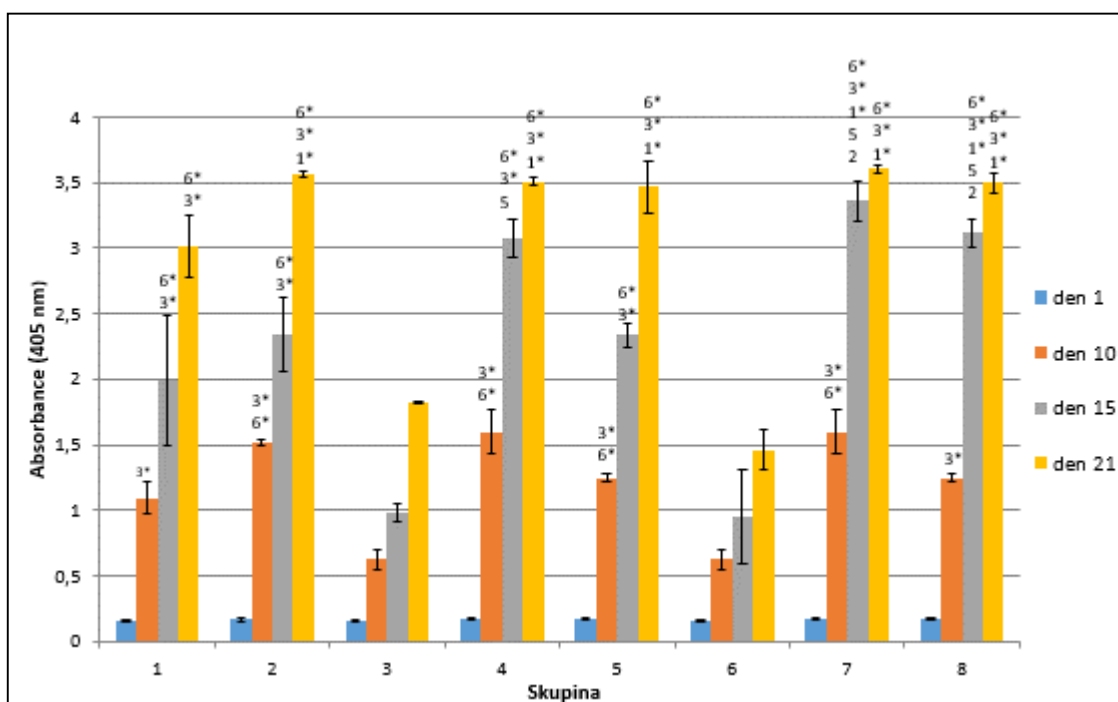
5.1.2.2 Kvantifikace obsahu buněčné DNA



Graf č. 7: Kvantifikace obsahu buněčné DNA v jedné jamce 96-ti jamkové destičky v experimentu číslo 2. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

První experimentální den bylo v jednotlivých skupinách naměřeno množství buněčné DNA v rozsahu 0,998 až 3,374 ng/jamka (v 96-ti jamkové destičce). Ve všech skupinách je nejvyšších koncentrací dosaženo 15. den experimentu. Nárůst množství DNA od prvního do patnáctého dne lze pozorovat ve skupinách 1, 2, 3 a 6. Ve skupinách 4, 5, 7 a 8 byl 10. den viditelný pokles hodnot následovaný zvýšením v 15. dnu. Ve všech skupinách pak došlo ke snížení hodnot mezi 15. a 21. dnem experimentu. Nejvyšší obsah buněčné DNA $7,27 \pm 2,145$ ng/jamka byl naměřen 15. den ve skupině 7 ovlivněné taurinem a bFGF v osteogenním mediu. Také v tomto experimentu si lze povšimnout velkých směrodatných odchylek u většiny vzorků. Vzhledem k velkému rozptylu hodnot nebyly naměřené rozdíly statisticky významné.

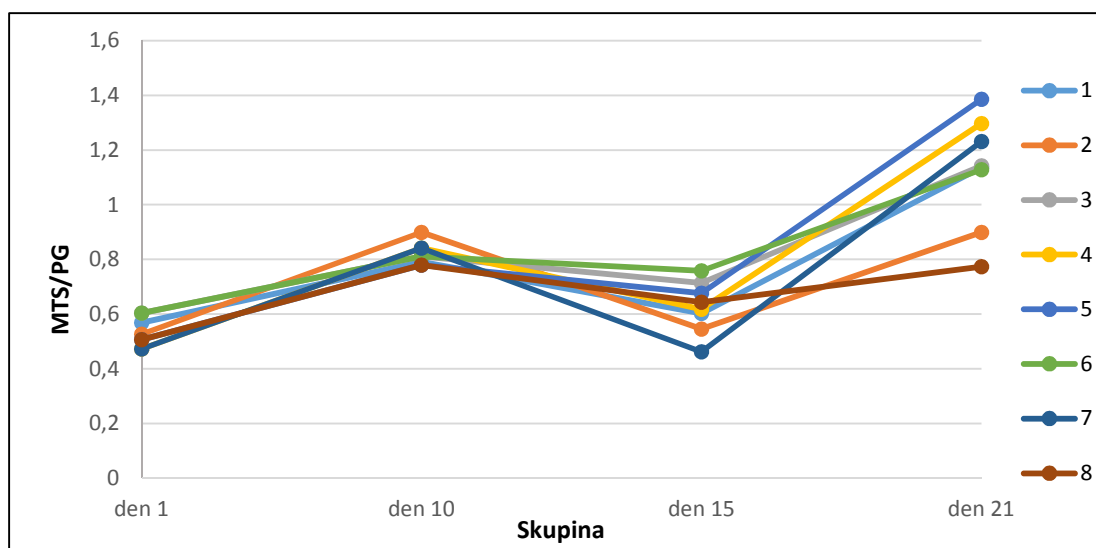
5.1.2.3 Aktivita alkalické fosfatázy



Graf č. 8: Aktivita alkalické fosfatázy v experimentu číslo 2. Naměřené hodnoty absorbance při 405 nm. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

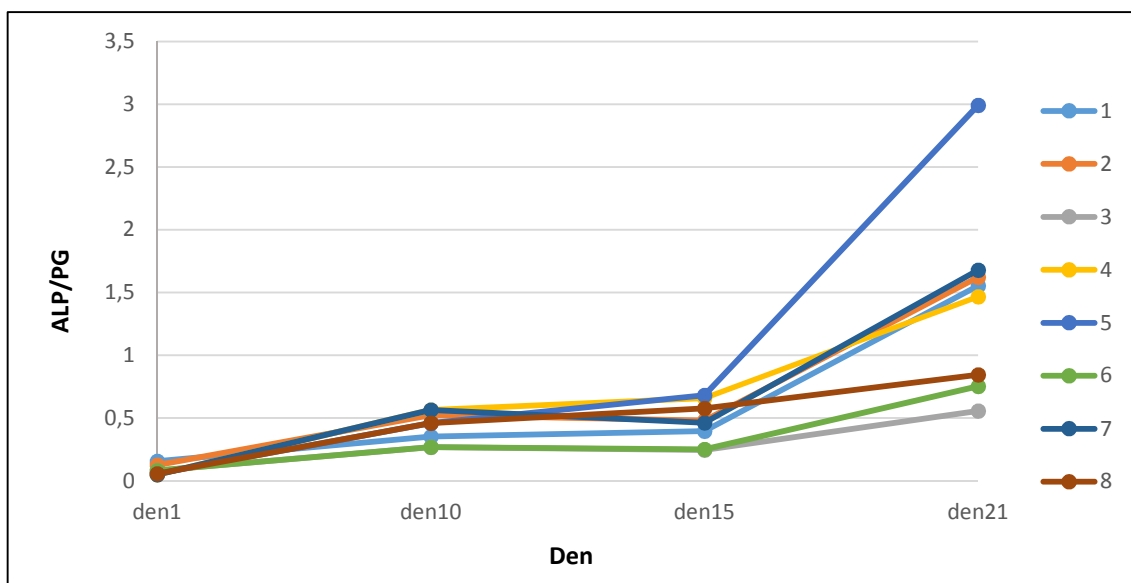
Aktivita alkalické fosfatázy byla první den po nasazení buněk na stejné hladině v průměru $0,165 \pm 0,009$. Po celou dobu třítydenního experimentu aktivita ALP rostla. Nejprudší nárůst mezi 1. a 10. dnem lze pozorovat ve skupinách 2, 4 a 7. Kromě skupin 4, 7 a 8 absorbance rostla plynule. V uvedených skupinách je znázorněno skokové navýšení mezi 10. a 15. dnem až o 100%. V uvedených skupinách byla aktivita ALP srovnatelná s 21. dnem. Skupina 4 byla kultivována v OM s taurinem a bFGF. Do osteogenního media pro skupinu 7 byl přidáván taurin, bFGF a v druhé fázi kultivace BMP-2. Skupina 8 byla ovlivňována taurinem, VEGF a v druhé fázi kultivace BMP-2 v OM. Kromě prvního dne byla kontinuálně nejméně aktivní ALP buněk ve skupinách 3 a 6 kultivovaných v osteogenním mediu s přísadkou taurinu a TGF- β a v případě skupiny 6 také BMP-2 v druhé fázi kultivace. Skupiny 3 a 6 také byly jedinou, které se 21. experimentální den výrazně lišily aktivitou alkalické fosfatázy od ostatních a dosahovaly jen asi polovičních hodnot.

5.1.2.4 Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku



Graf č. 9: Metabolická aktivita přepočítaná na jednu buňku pomocí poměru absorpance při 490 nm ku hmotnosti buněčné DNA v experimentu číslo 2. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafu č. 9 znázorňujícího metabolickou aktivitu jedné buňky vyplývá, že první den byla tato hodnota v rozmezí 0,507 až 0,604. Následně ve všech skupinách mírně stoupala do 10. dne. 15. den je ukázán pokles hodnot, které však do 21. dne opět vzrostly. Nejvyšší hodnoty 1,386 bylo dosaženo 21. den ve skupině 5 kultivované s taurinem a VEGF v OM. Naopak nejnižší metabolická aktivita v 21. dnu byla zaznamenána ve skupině 8 ($0,774 \pm 0,031$). Do osteogenního media pro skupinu 8 byla přidávána kombinace taurinu a VEGF a v druhé fázi kultivace také BMP-2.

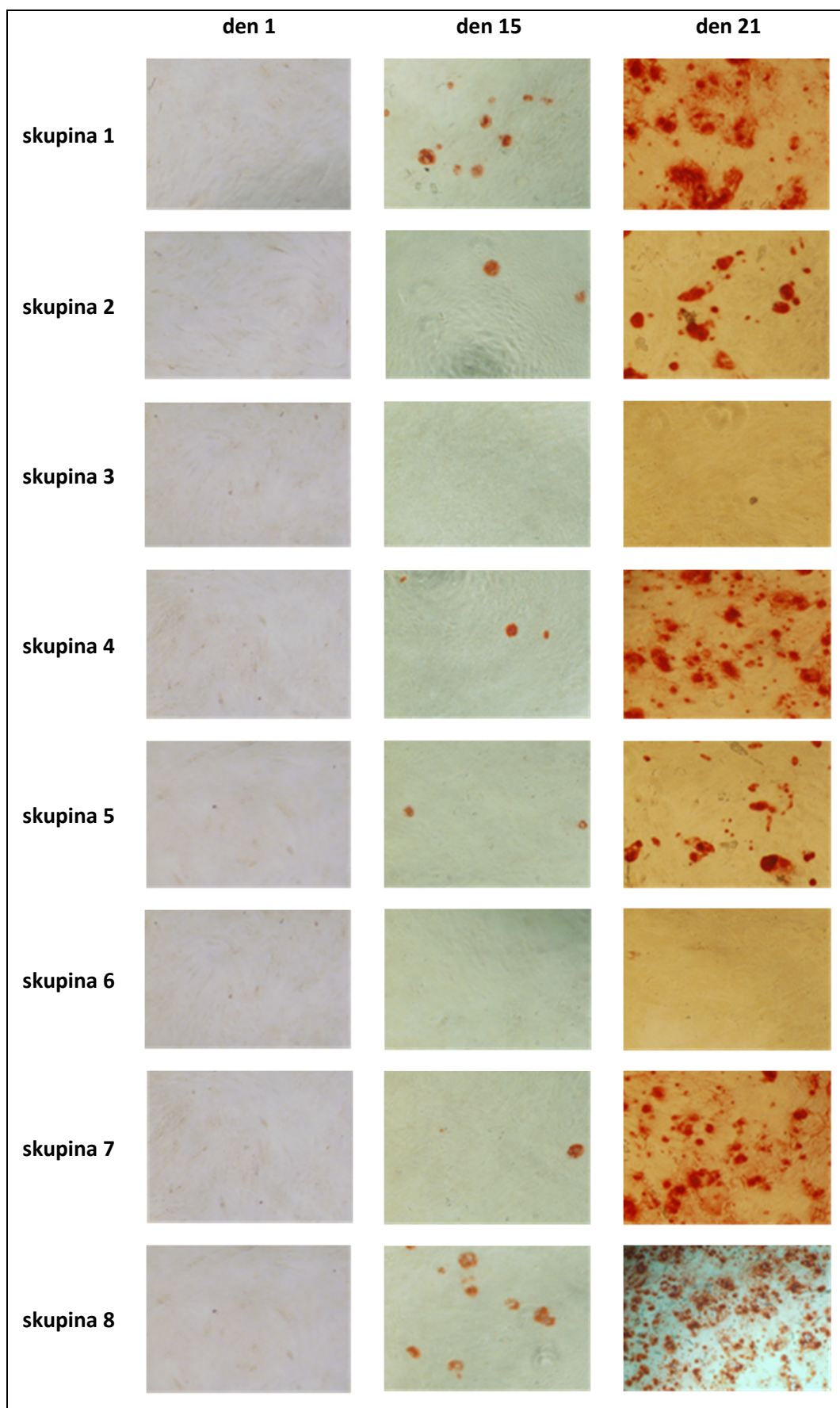


Graf č. 10: Úroveň aktivity alkalické fosfatázy přepočítaná na jednu buňku vydělením absorpance při 405 nm hmotností buněčné DNA v experimentu číslo 2. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Hodnoty aktivity ALP dosažené první den byly v rozpětí 0,08 až 0,157. Den 10. byl ve všech skupinách zaznamenán růst. Maximální hodnoty 0,565 bylo dosaženo ve skupinách 4 a 7. Mezi 10. a 15. dnem zůstávala aktivita na stejné hladině (ve skupinách 1, 2, 3 a 6) nebo se mírně zvýšila (skupiny 4, 5, 8). Ve skupině 7 došlo jako v jediné k poklesu a to o jednu desetinu. Nejvýraznější změny jsou viditelné mezi 15. a 21. dnem. Křivka strmě roste u skupiny 5 kultivované s přidávkou taurinu a VEGF v OM. V této skupině bylo také dosaženo nejvyšší hodnoty ze všech vzorků ($2,991 \pm 0,098$). Se vzájemně srovnatelnou intenzitou rostly hodnoty ve skupinách 1, 2, 4 a 7, které dosáhly maxima průměrně v bodě 1,581. Pro skupiny 5, 6 a 8 je znázorněn pouze mírný nárůst aktivity ALP v jedné buňce.

5.1.2.5 Detekce mineralizace

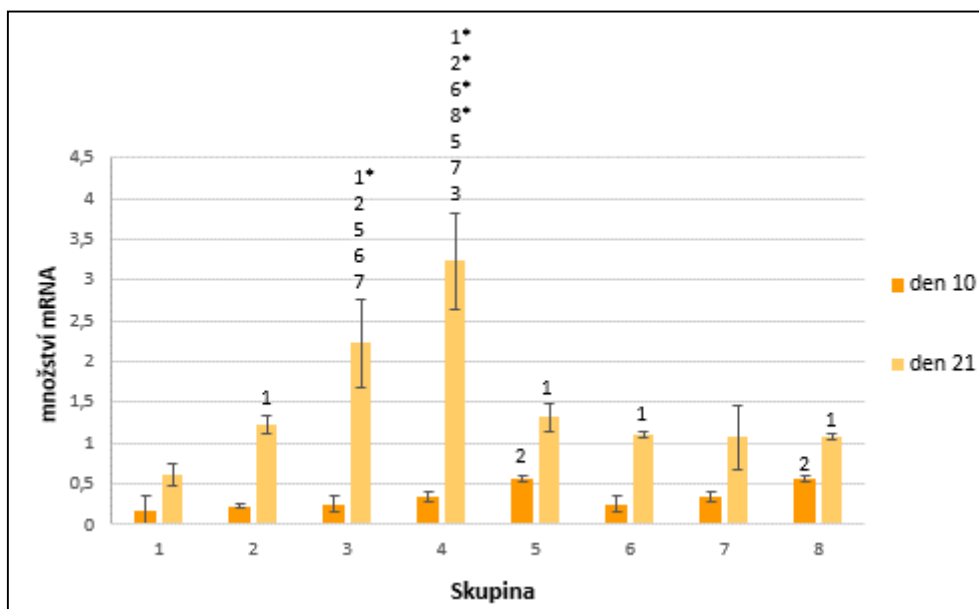
Vzorky byly nabarveny Alizarinem Red S, který se váže na přítomnou mineralizaci. Oblasti s deponovaným kalcem jsou pak pozorovatelné jako červené skvrny na dně jamky. Vzorky byly foceny mikroskopem se stonásobným zvětšením.



Obrázek č. 12: Detekce mineralizace pomocí Alizarinu Red S. Snímky ze světelného mikroskopu. Zvětšeno 10x.

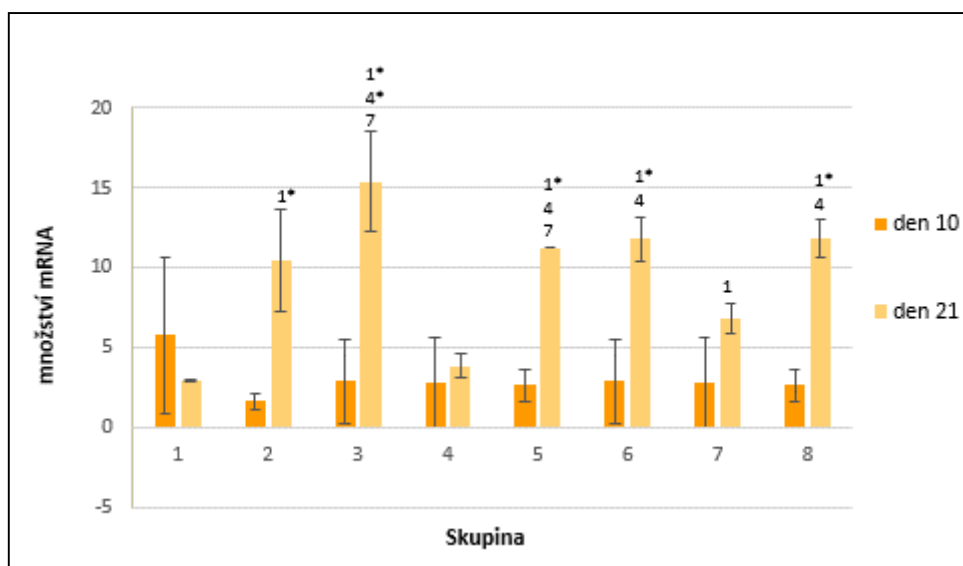
Jak ilustrují snímky, první experimentální den nebyla v žádné ze skupin přítomna mineralizace. 15. den experimentu lze vidět počínající mineralizaci ve skupinách 1, 2, 4, 5, 7 a 8. Přičemž ve skupinách 1 (kontrola) a 8 bylo přítomno viditelně více center než ve skupinách 2, 4, 5 a 7. Snímky z 21. dne ukazují, že mineralizace bylo přítomna celkem v šesti skupinách. V nejvyšší míře to bylo ve skupinách 1 (kontrola), 4, 7 a 8. Skupina 1 byla kultivována v osteogenním mediu. Buňky skupiny 4 byly vystaveny působení taurinu a bFGF v OM. Do osteogenního media pro skupinu 7 byl přidáván taurin, bFGF a v druhé fázi kultivace také BMP-2. Skupina 8 měla medium o stejném složení jako skupina 7, pouze místo bFGF byl dodáván VEGF. Ve zbývajících skupinách 2 a 5 bylo detekováno ukládání minerálních látek v nižší míře. Mineralizace nebyla ani 21. den prokázána ve skupinách 3 a 6. Obě skupiny byly ovlivněny přítomností taurinu a TFG- β , v případě skupiny 6 byl v druhé fázi experimentu přidáván také BMP-2.

5.1.2.6 RT-PCR



Graf č. 11: Množství mRNA pro RunX2 v buňkách v experimentu číslo 2. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Desátý experimentální den byla exprese mRNA po RunX2 na srovnatelné úrovni. Signifikantní rozdíl byl naměřen ve skupinách 5 a 8 vzhledem ke skupině 2. Buňky ve skupině 5 byly kultivovány s přidavkem taurinu a VEGF v osteogenním mediu. Ve skupině 8 bylo v první fázi experimentu použito medium se stejným složením jako ve skupině 5 a ve druhé fázi byl přidáván ještě BMP-2. V posledním dnu experimentu byla naměřena nejvyšší exprese RunX2 ve skupině 4 s taurinem a bFGF s OM. V této skupině byla exprese signifikantně vyšší než ve skupinách 1, 2, 3, 5, 6, 7 a 8. Nejnižší hodnoty pak byly naměřeny ve skupině 1 (kontrola). Úroveň exprese byla signifikantně nižší než ve skupinách 2, 3, 4, 5, 6 a 8.



Graf č. 12: Množství mRNA pro kolagen typu I v buňkách v experimentu číslo 2. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafu č. 12 je patrné, že 10. experimentální den byly v expresi RNA pro kolagen typu I (Coll) zaznamenány velké směrodatné odchylky a tedy žádné statisticky významné hodnoty. Ve 21. dnu byly signifikantní rozdíly naměřeny ve skupinách 2, 3, 5, 6, 7 a 8. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo ve skupinách 3 a 4. Skupina 3 byla ovlivňována taurinem a TGF- β v osteogenním mediu. K buňkám ve skupině 4 byl do osteogenního media přidáván taurin a bFGF. Obě skupiny vykazovaly signifikantně vyšší hladinu exprese Coll než skupiny 1, 4 a 7. Nejnižší hladina mRNA pro kolagen typu I byla 21. den dosažena v kontrolní skupině 1 kultivované pouze v osteogenním mediu. Míra exprese byla srovnatelná s expresí ve skupinách 2, 5 a 8, která však byla naměřena již v 10. experimentálním dnu.

5.1.3 Experiment číslo 3

V průběhu experimentu číslo 3 byly buňky po dobu 21 dní kultivovány na plastiku v osteogenním mediu skládajícím se z MEM, 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin, 10 mM β -glycerol fosfátu, 100nM dexamethasonu a 100 μ M askorbátu. Jednotlivé skupiny se od sebe lišily přidávkou dalších suplementů podle následujícího schématu:

skupina 1 ... OM

skupina 2 ... OM + TGF- β + bFGF

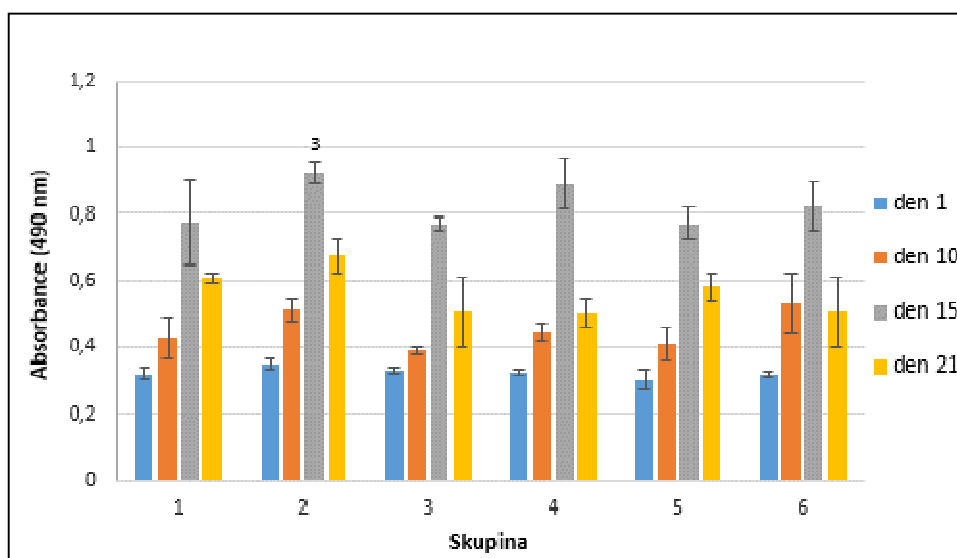
skupina 3 ... OM + taurin

skupina 4 ... OM + taurin + HGF

skupina 5 ... OM + taurin + bFGF

skupina 6 ... OM + taurin + IGF-1

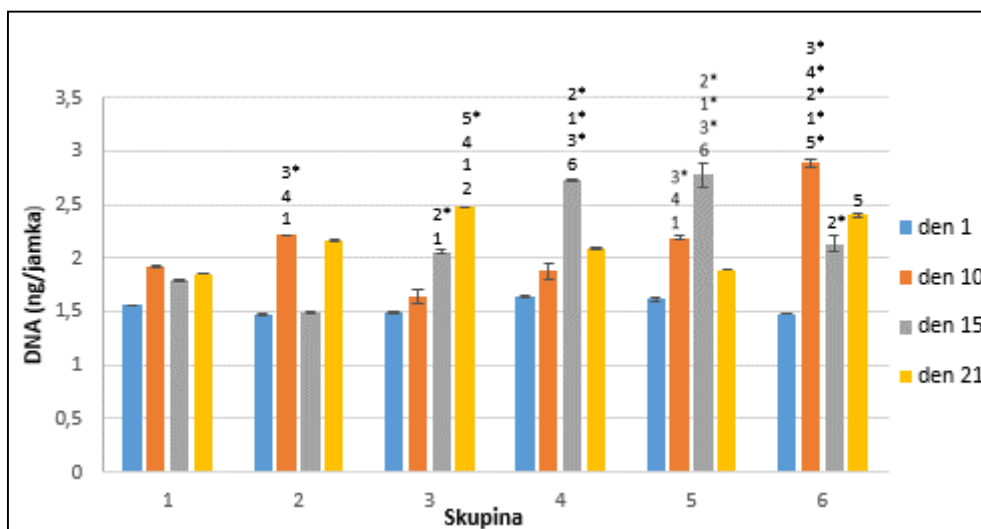
5.1.3.1 MTS test



Graf č. 13: Metabolická aktivita buněk hodnocená MTS testem v experimentu číslo 3. Naměřené hodnoty absorbance při 490 nm. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Graf č. 13 ukazuje, že první experimentální den byla naměřena absorbance $0,325 \pm 0,015$. V jednotlivých skupinách tedy byly buňky na velmi podobné úrovni metabolismu. Ve všech skupinách je patrný stejný průběh vývoje metabolické aktivity. Od 1. do 15. dne ukazovala intenzita absorbance růst buněčného metabolismu. Přičemž zvýšení mezi 1. a 10. dnem bylo výrazně menší než to mezi 10. a 15. experimentálním dnem. 15. den byla signifikantně vyšší metabolická aktivita buněk naměřena ve skupině 2 ovlivňované TGF- β + bFGF v OM vzhledem ke skupině 3 s osteogenním médiem a taurinem. Ve 21. dnu bylo ve všech skupinách pozorováno snížení absorbance. Nejvýrazněji, o 0,386, poklesly hodnoty ve skupině 4. V rámci srovnání mezi skupinami nebyly poslední den experimentu naměřeny statisticky významné rozdíly.

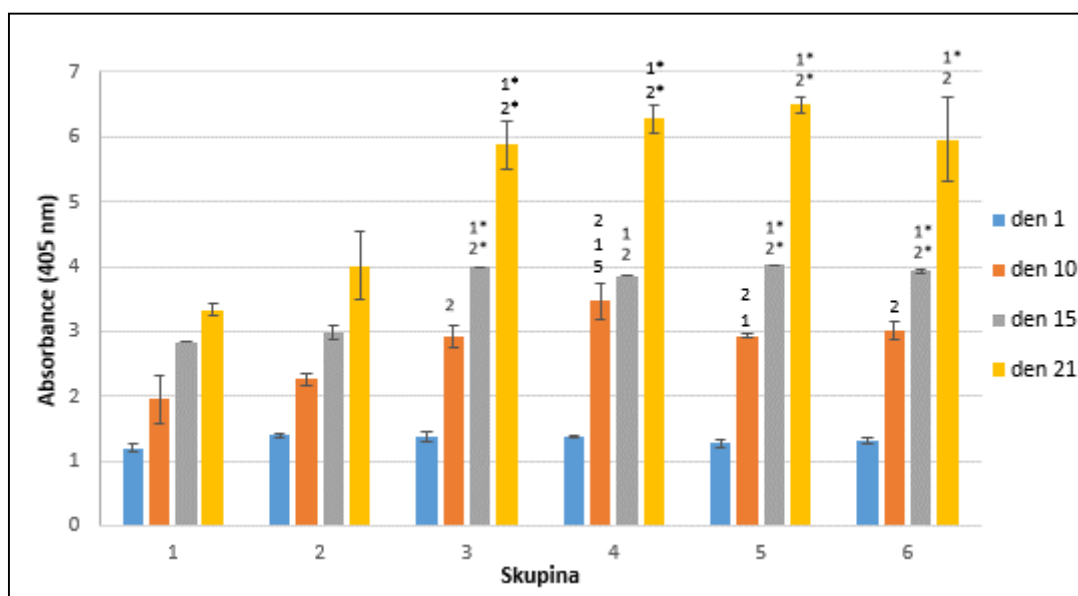
5.1.3.2 Kvantifikace obsahu buněčné DNA



Graf č. 14: Kvantifikace obsahu buněčné DNA v jedné jamce v experimentu číslo 3. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.

V grafu č. 14 je vidět, že první experimentální den bylo ve všech jamkách naměřeno velmi podobné množství DNA o váze $1,543 \pm 0,076$ ng/jamka. V 10. dnu experimentu byly statisticky významné rozdíly zaznamenány ve skupinách 2, 5 a 6. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo ve skupině 6 kultivované s přidávkou taurinu a IGF-1 v osteogenním mediu, kde bylo množství DNA signifikantně vyšší než ve všech ostatních skupinách. 15. experimentální den vykazovaly nejvíce DNA v jamce skupiny 4 a 5. Poslední den experimentu byl viditelný pokles obsahu DNA oproti předchozím dnům ve všech skupinách kromě skupiny 3, kde byly naměřené hodnoty nejvyšší za celou dobu experimentu. Skupina 3 také byla jediná, kde bylo ukázáno postupné zvyšování obsahu buněčné DNA a tedy přibývání buněk v jamce. V kontrolní skupině 1 nebyla po celou dobu experimentu zaznamenána téměř žádná změna. Ve skupinách 2 a 6 bylo nejvyšších hodnot dosaženo 10. den, zatímco ve skupinách 4 a 5 to byl den 15.

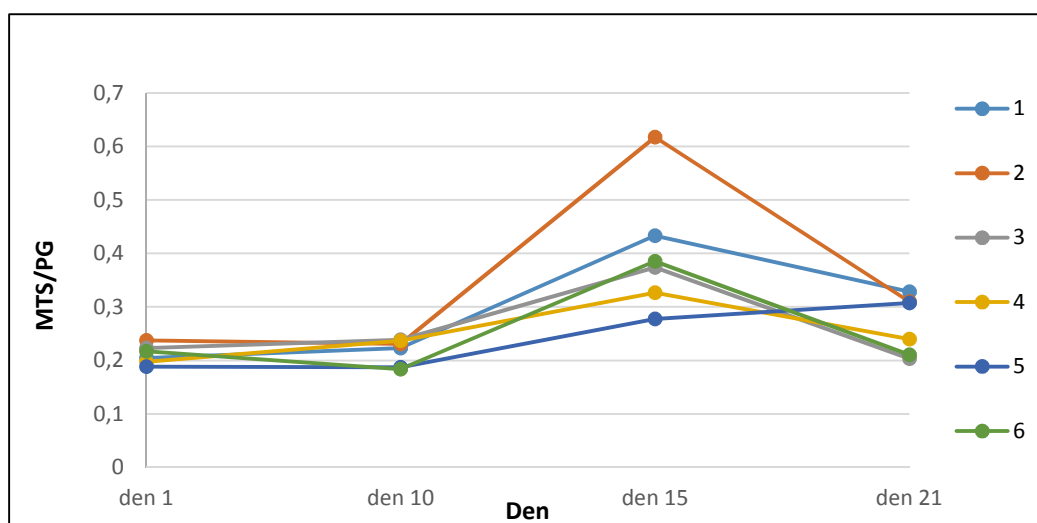
5.1.3.3 Aktivita alkalické fosfatázy



Graf č. 15: Aktivita alkalické fosfatázy v experimentu číslo 3. Naměřené hodnoty absorbance při 405 nm. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

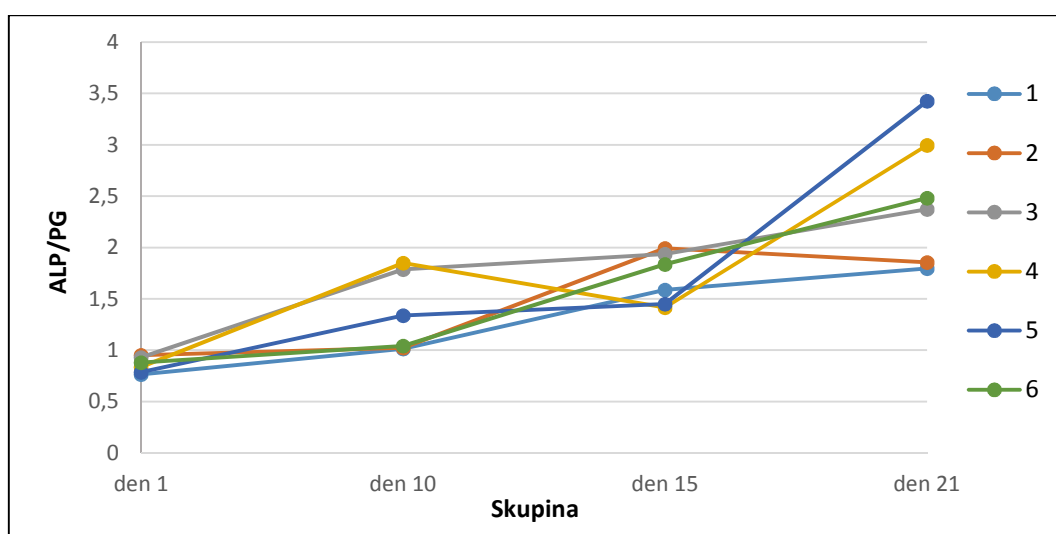
Data znázorněná v grafu č. 15 ukazují, že první experimentální den byla aktivita ALP ve všech skupinách na stejné úrovni a bez signifikantních rozdílů. Po celou dobu experimentu je rovněž ve všech vzorcích viditelné postupné zvyšování absorbance dokumentující rostoucí aktivitu ALP. Maximální hodnoty dosažené 21. den se mezi sebou však liší. Ve skupinách 3, 4, 5 a 6 byla naměřena statisticky výrazně vyšší absorbance než ve skupinách 1 a 2, ve kterých se aktivita alkalické fosfatázy pohybovala jen asi na poloviční hladině. Ve skupinách 3, 4, 5 a 6 byl jednou ze složek kultivačního media taurin, zatímco skupiny 1 a 2 byly po celou dobu experimentu bez jeho přísad. U skupin 1, 2 a 3 byl nárůst pravidelný, zatímco skupiny 4, 5 a 6 vykazovaly spíše skokové změny. A to především mezi 1. a 10. dnem a mezi 15. a 21. dnem. Rozdíly mezi 10. a 15. dnem v nich nejsou tak výrazné.

5.1.3.4 Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku



Graf č. 16: Metabolická aktivita přepočítaná na jednu buňku pomocí poměru absorbance při 490 nm ku hmotnosti buněčné DNA v experimentu číslo 3. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

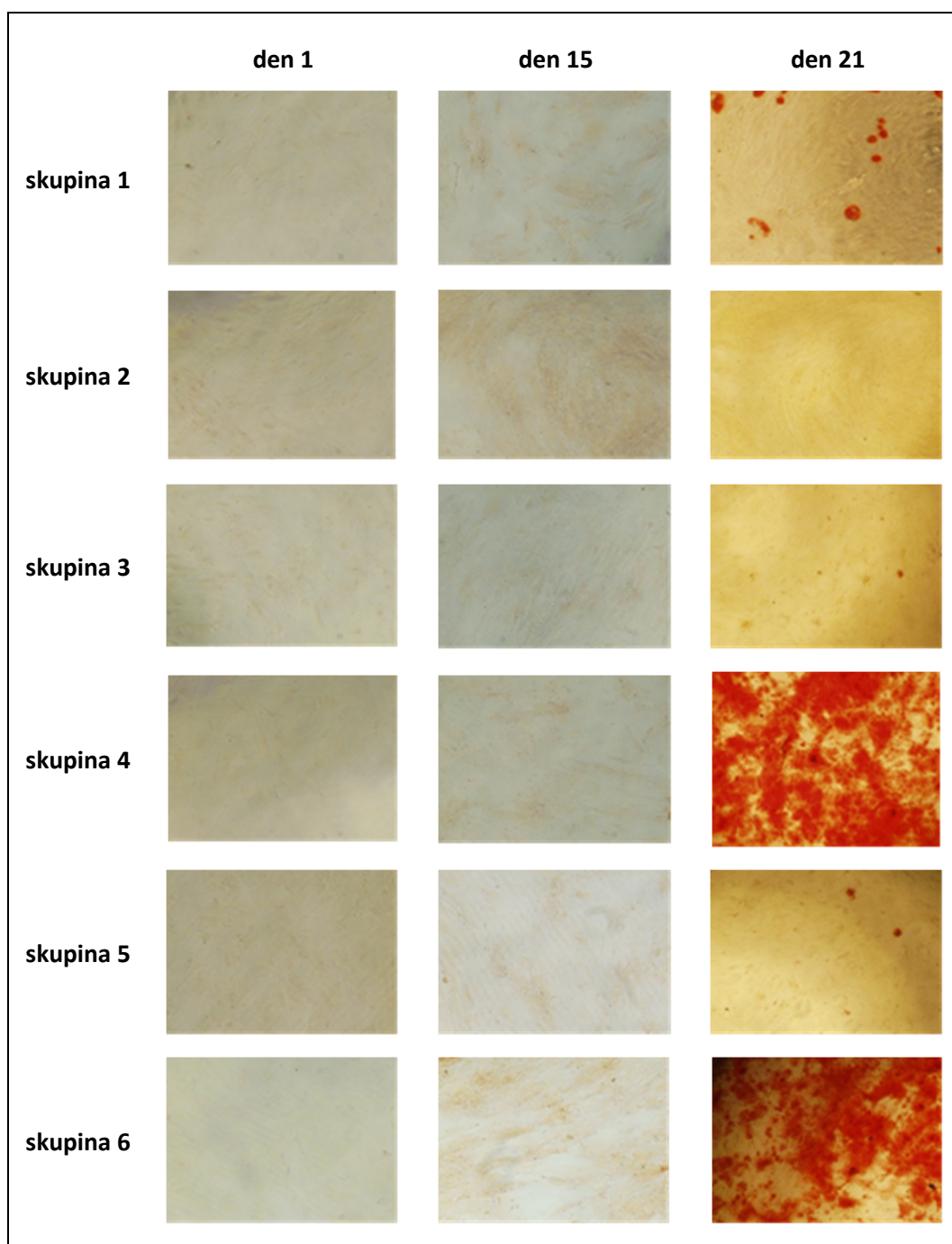
Po vydělení hodnot absorbance při 490 nm množstvím buněčné DNA je z grafu č. 16 vidět, že první den experimentu byla úroveň metabolické aktivity pro jednu buňku ve všech skupinách srovnatelná ($0,211 \pm 0,018$). Mezi 1. a 10. dnem nedošlo nárůstu ani poklesu hodnot. Od 10. experimentálního dne byl pozorován nárůst buněčného metabolismu. Nejstrměji stoupá křivka skupiny 2 (TGF- β + bFGF + OM). Nejméně výrazný nárůst je naopak znázorněn pro skupinu 5, kde byly buňky kultivovány s přidávkou bFGF a taurinu v OM. Po nejvyšších hodnotách dosažených 15. den začala metabolická aktivita klesat ve všech skupinách kromě skupiny 5, ve které byl zachován vzestupný charakter křivky.



Graf č. 17: Úroveň aktivity alkalické fosfatázy přepočítaná na jednu buňku vydělením absorbance při 405 nm hmotností buněčné DNA v experimentu číslo 3. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafu č. 17 vyplývá, že první experimentální den dosahovala aktivita alkalické fosfatázy přepočítaná na jednu buňku podobných hodnot ($0,857 \pm 0,076$). Nejvíce mezi 1. a 10. aktivita rostla ve skupinách 3 a 4. Za stejné období nejméně ve skupině 1 (kontrola). Jedinou skupinou, ve které se aktivita ALP mezi 10. a 15. dnem experimentu snížila, byla skupina 4 obsahující OM s taurinem a HGF. V této skupině byl však mezi 15. a 21. dnem zaznamenán druhý nejvýraznější nárůst hodnot. Nejvyšší rozdíl hodnot mezi 15. a 21. dnem byl naměřen pro skupinu 5. V této skupině byla také dosažena nejvyšší míra aktivity ALP za celý experiment. Skupina 5 byla po celou dobu experimentu ovlivňována kombinací taurinu a bFGF v osteogenním mediu. Naopak nejnižší úroveň bylo 21. den dosaženo v kontrolní skupině 1 bez přísad taurinu i růstových faktorů.

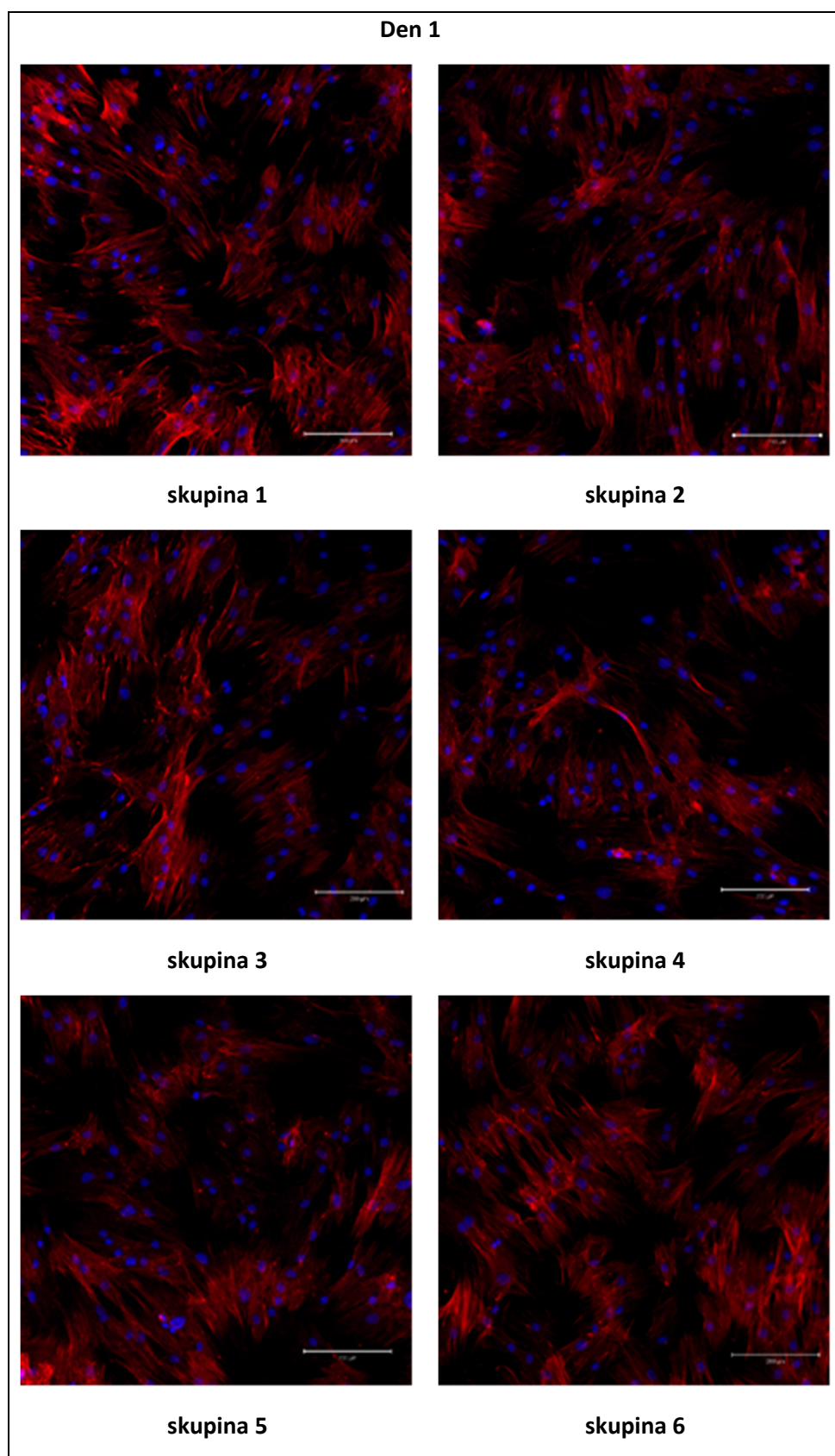
5.1.3.5 Detekce mineralizace



Obrázek č. 13: Detekce mineralizace pomocí Alizarinu Red S. Snímky ze světelného mikroskopu. Zvětšeno 10x.

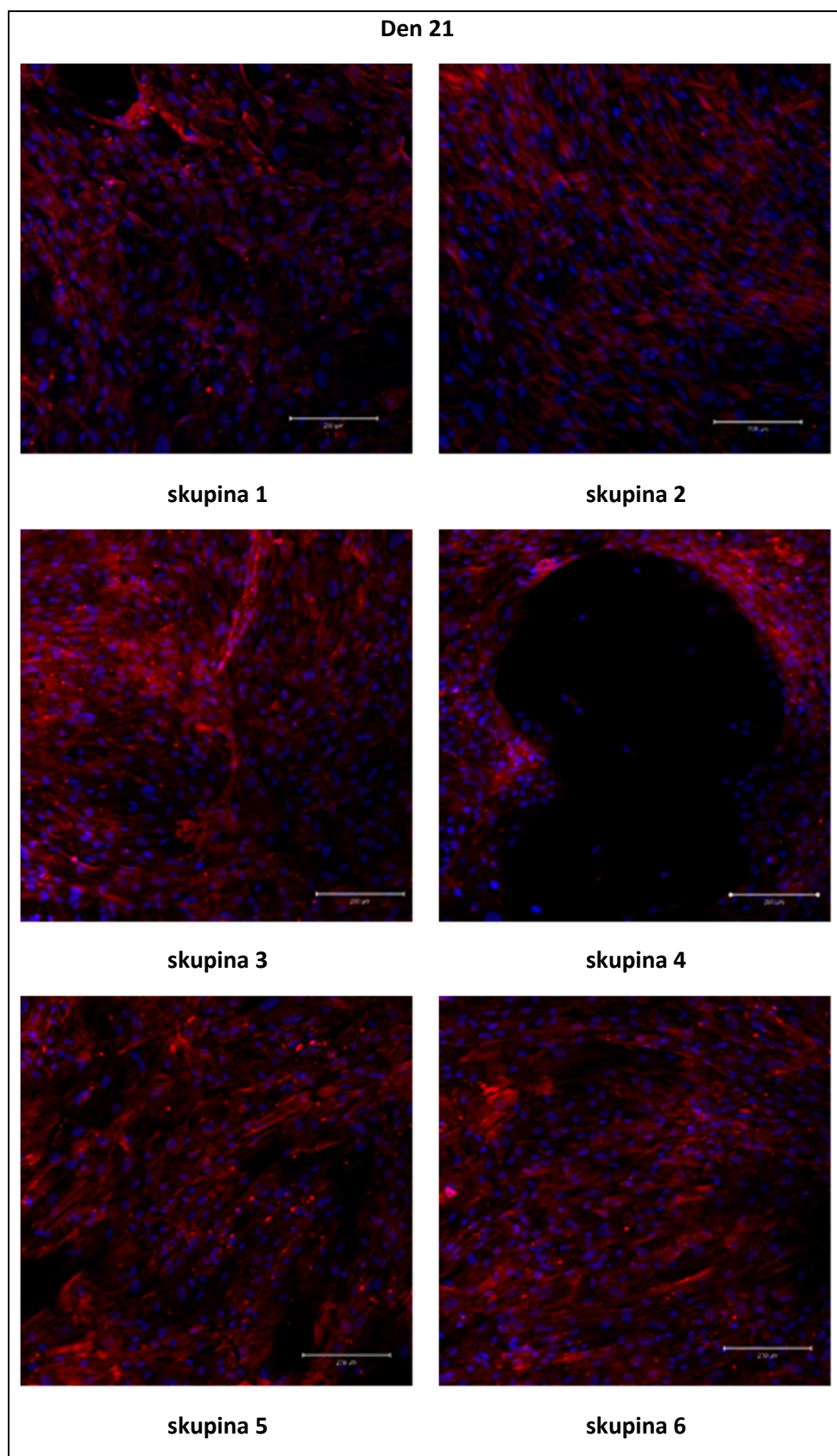
Jak lze vidět na obrázku č. 13, od 1. do 15. experimentálního dne nebyly v žádném ze vzorků ukládány minerální látky. Ve 21. experimentálním dnu je mineralizace v rozdílné míře pozorovatelná ve skupinách 1, 4, 5 a 6. Ve skupině 1 (kontrola) je patrných několik center. Pouze dvě červené oblasti jsou viditelné ve skupině 5 ovlivňované bFGF v OM. Naopak výrazná mineralizace byla přítomna ve skupinách 4 a 6. Buňky ve skupině 4 byly vystaveny působení taurinu a HGF v OM, zatímco do osteogenního media s taurinem byl pro skupinu 6 přidáván IGF-1.

5.1.3.6 Vizualizace buněk - konfokální mikroskopie



Obrázek č. 14: Vizualizace buněk adherovaných na sklíčkách 1. den experimentu 3. Modře nabarvená jádra, červeně aktinový cytoskelet. Velikost měřky je 200 μm, zvětšeno 100x.

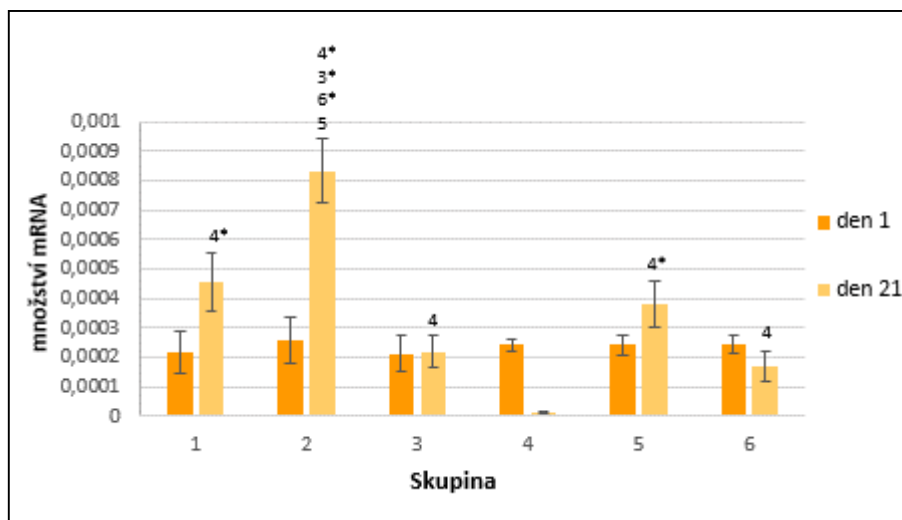
Na obrázku č. 14 je vidět, že počet v buněk ve všech skupinách je první den po nasazení srovnatelný. Lze tak soudit především podle počtu modře fluoreskujících jader. Lidské MSC byly relativně rovnoměrně rozmístěny po celém sklíčku a netvořily shluky. Ve všech vzorcích jsou dobře viditelná cytoskeletární vlákna. Buňky adherovaly na podklad a díky dostatku volného prostoru se mohly dostatečně „rozprostřít“.



Obrázek č. 15: Vizualizace buněk adherovaných na sklíčkách 21. den experimentu 3. Modře nabarvená jádra, červeně aktinový cytoskelet. Velikost měřky je 200 μm, zvětšeno 100x.

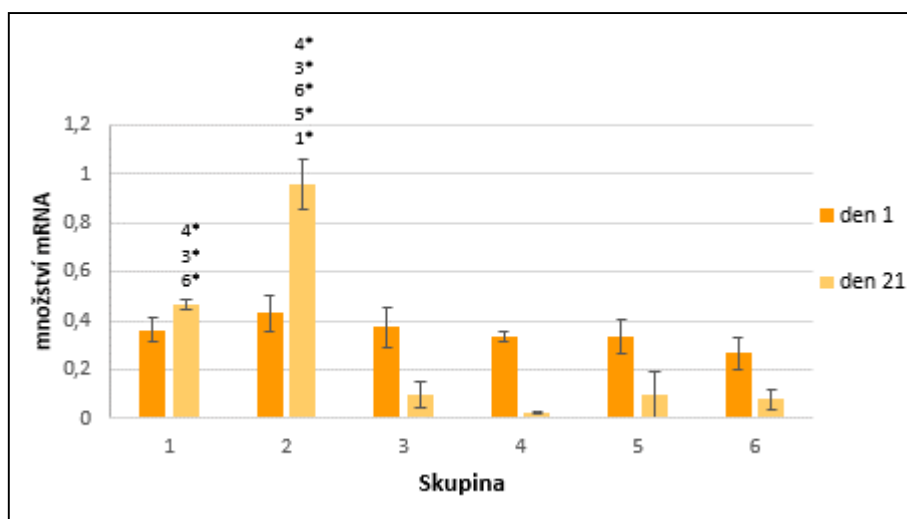
Na obrázku č. 15 z 21. experimentálního dne lze pozorovat, že buněk ve všech skupinách výrazně přibýlo. Rovněž byla zaznamenána změna morfologie jader na menší a protáhlejší. Změny morfologie celé buňky případně cytoskeletu pozorovány nebyly. Důvodem bylo, že v posledním dni experimentu buňky tvořily konfluentní vrstvu a často se překrývaly. Ve skupině 4 se vrstva již slupovala a ve vzniklých mezerách docházelo k opětovnému usidlování buněk. Také lze ve všech skupinách, vyjma skupiny 2, pozorovat jasněji viditelné červené body.

5.1.3.7 RT-PCR



Graf č. 18: Množství mRNA pro RunX2 v buňkách v experimentu číslo 3. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Jak ukazuje graf č. 18, exprese mRNA transkripčního faktoru RunX2 byla v prvním experimentálním dnu u všech skupin na podobné úrovni bez statisticky významných rozdílů. 21. experimentální den byla nejvyšší exprese naměřena ve skupině 2 (OM + TGF- β + bFGF). Tato hodnota byla signifikantně vyšší než ve skupinách 3, 4, 5 a 6. Nejnižší exprese byla zaznamenána ve skupině 4 (OM + taurin + HGF). Ve skupinách 1 (kontrola), 2 a 5 lze pozorovat zvýšení množství mRNA mezi 1. a 21. dnem kultivace. Ve skupinách 4 a 5 naopak došlo k poklesu hodnot. Beze změny zůstala exprese RunX2 ve skupině 3 (OM + taurin).



Graf č. 19: Množství mRNA pro kolagen typu I v buňkách v experimentu číslo 3. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

V grafu č. 19 lze vidět, že první den po nasazení byla exprese kolagenu typu I ve všech experimentálních skupinách na srovnatelné úrovni a bez statisticky významných rozdílů. Nejnižší exprese mRNA pro kolagen typu I byla 21. den naměřena ve skupině 4 (OM + taurin + HGF). Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo ve skupině 2 (OM + TGF- β + bFGF). Byla signifikantně vyšší v porovnání se všemi ostatními skupinami. Ve skupinách 3, 4, 5 a 6 došlo mezi 1. a 21. dnem k poměrně výraznému poklesu exprese. V kontrolní skupině a ve skupině 2 bylo naopak naměřen nárůst úrovně exprese mezi těmito dvěma experimentálními dny.

5.2 TAURIN

V posledním experimentu byl porovnáván efekt dvou různých koncentrací taurinu na osteogenní diferenciaci MSC. Do osteogenního media (MEM, 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin, 10 mM β -glycerol fosfát, 100nM dexamethason a 100 μ M askorbát) byl přidáván taurin v koncentraci 10 mM respektive 20 mM. Ve skupinách 4 a 6 byl navíc kombinován s 10 ng/ml bFGF. Buňky byly kultivovány na plastiku po dobu 21 dní. Skupiny vystavené působení taurinu byly porovnány se skupinami kultivovanými v mediu bez jeho přídatku. Jednotlivé suplementy byly do media přidávány podle následujícího schématu:

skupina 1 ... OM

skupina 2 ... OM + 10 ng/ml bFGF

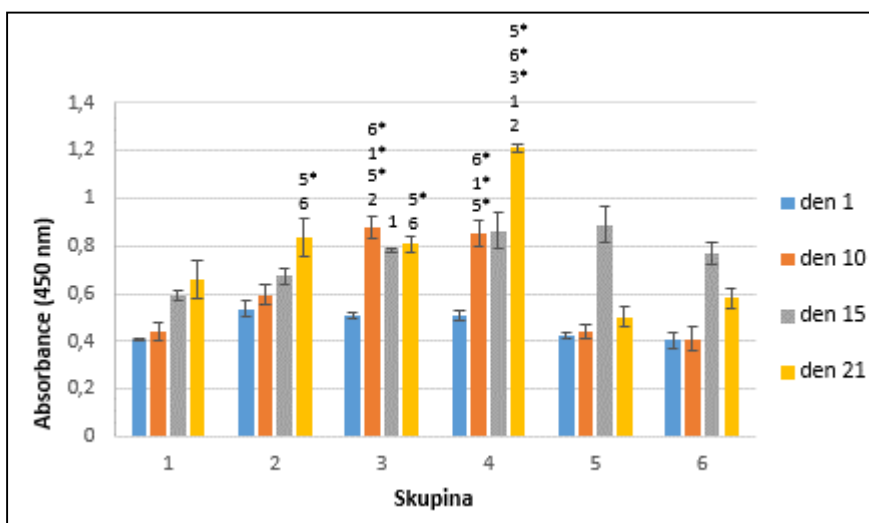
skupina 3 ... OM + 10 mM taurin

skupina 4 ... OM + 10 mM taurin + 10 ng/ml bFGF

skupina 5 ... OM + 20 mM taurin

skupina 6 ... OM + 20 mM taurin + 10 ng/ml bFGF

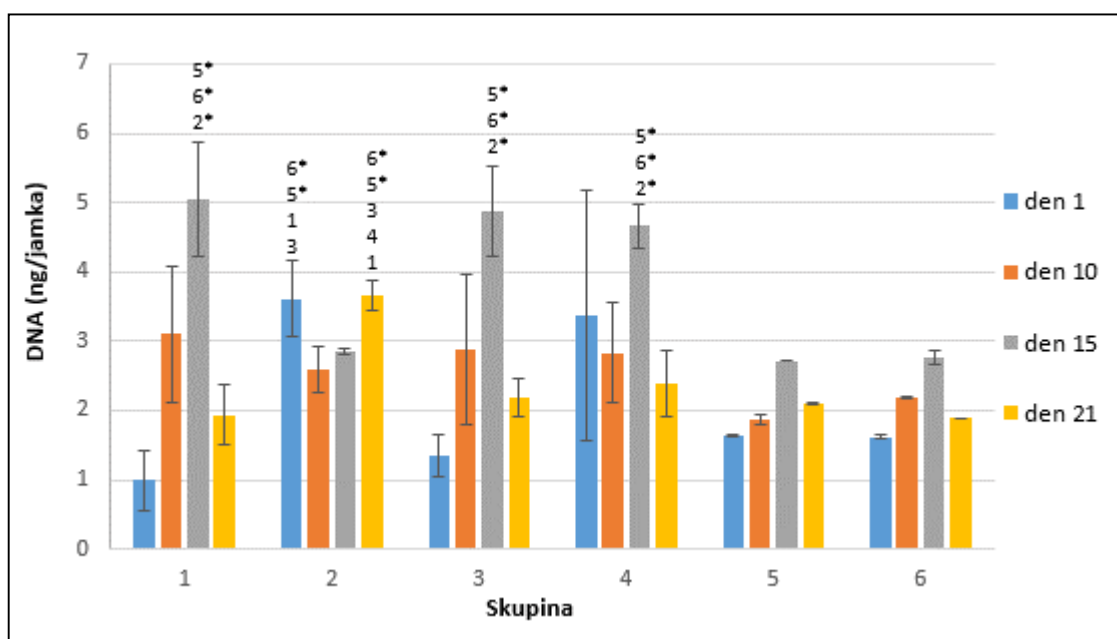
5.2.1 MTS test



Graf č. 20: Metabolická aktivita buněk hodnocená MTS testem v experimentu hodnotícím vliv různé koncentrace taurinu na osteogenezi MSC. Naměřené hodnoty absorbance při 490 nm. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

První den po nasazení nebyly v metabolické aktivitě buněk zaznamenány statisticky významné rozdíly. Úroveň buněčného metabolismu rostla po celou dobu experimentu ve skupinách 1, 2 a 4. Ve skupinách 1 a 2 byl růst metabolismu po celou dobu experimentu pozvolný. Ve skupině 4 došlo ke skokovému zvýšení mezi 1. a 10. dnem a mezi 15. a 21. dnem. Ve skupině 3 bylo nejvyšší úrovně metabolismu dosaženo 15. den experimentu. Následoval mírný pokles. Ve skupinách 5 a 6 je pozorovatelný stejný trend ve vývoji metabolické aktivity. Nejvyšších hodnot buňky dosáhly 15. den, poté následoval pokles. Ve skupinách 5 a 6 byl přítomen taurin o koncentraci 20 mM. Signifikantně nejvyšších hodnot buněčného metabolismu bylo dosaženo 21. den ve skupině 4. Kde byla naměřená úroveň vyšší než ve skupinách 1, 2, 3, 5 a 6.

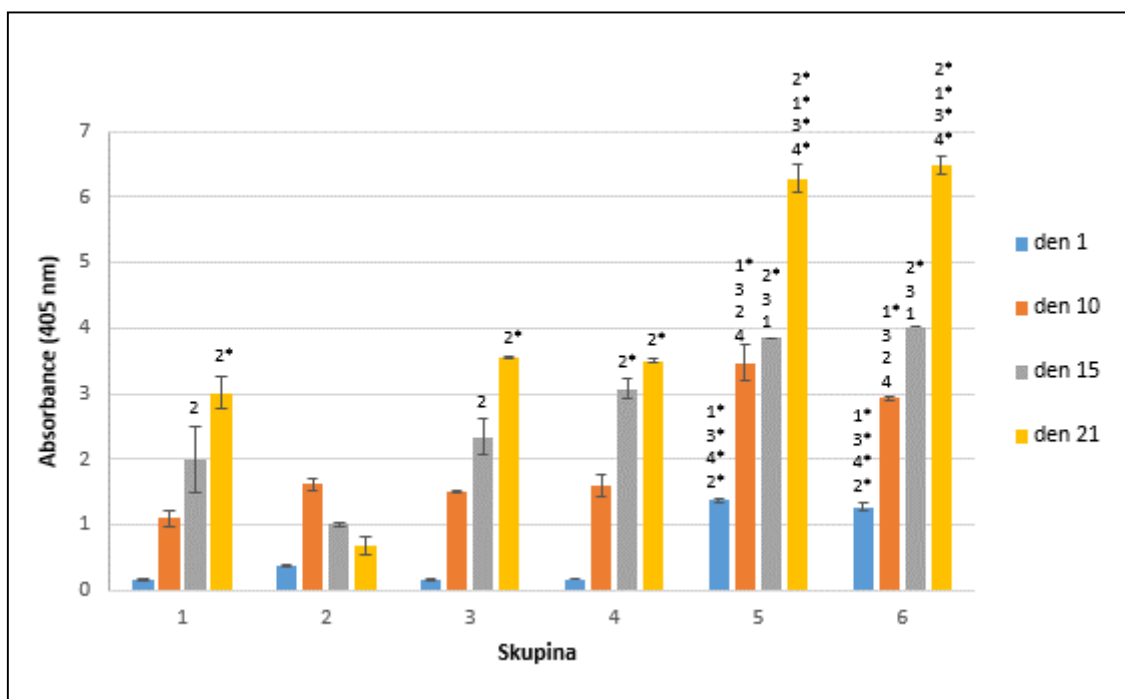
5.2.2 Kvantifikace obsahu buněčné DNA



Graf č. 21: Kvantifikace obsahu buněčné DNA v jedné jamce v experimentu hodnotícím vliv různé koncentrace taurinu na osteogenezi MSC. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.

Signifikantně vyšší množství DNA bylo první den naměřeno ve skupině 2 kultivované s přidávkou bFGF v osteogenním mediu. Statisticky významné rozdíly byly pozorovány v porovnání se skupinami 1, 3, 5 a 6. Množství buněčné DNA až do 15. dne rostlo ve skupinách 1, 3, 5 a 6. 21. den došlo v těchto skupinách k úbytku obsahu DNA ve vzorcích. Ve skupině 2 byly hodnoty naměřené 1. a 21. den srovnatelné, 10. a 15. den byla aktivita ALP na nižší úrovni. Kvantifikace množství DNA ve skupině 4 byla ztížena velkými odchylkami dat. Přesto je v této skupině pozorovatelný sestupný charakter, výjimkou je 15. den, kdy došlo nárůstu absorbance.

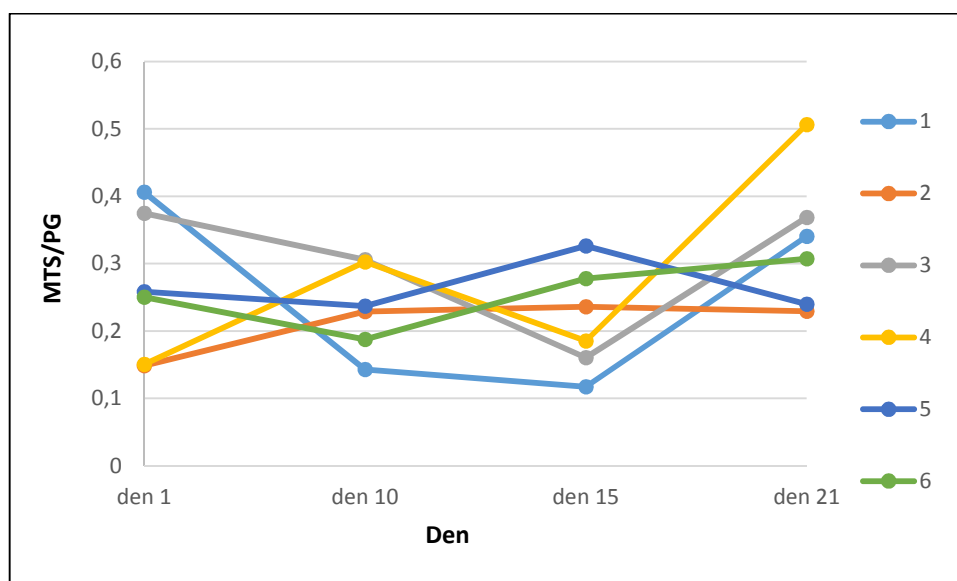
5.2.3 Aktivita alkalické fosfatázy



Graf č. 22: Aktivita alkalické fosfatázy v experimentu hodnotícím vliv různé koncentrace taurinu na osteogenezi MSC. Naměřené hodnoty absorbance při 405 nm. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

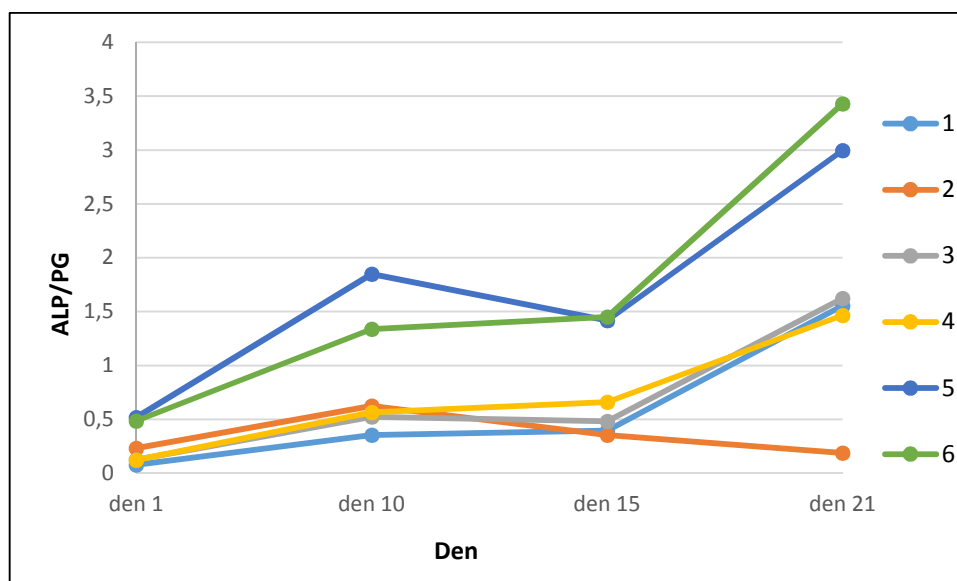
Graf č. 22 ukazuje, že 1. den byla signifikantně vyšší aktivita ALP naměřena ve skupinách 5 a 6, a to v porovnání se všemi ostatními skupinami. Stejně tak 10. den bylo v těchto skupinách dosaženo signifikantně vyšších hodnot. Aktivita alkalické fosfatázy se v průběhu celého experimentu zvyšovala ve skupinách 1, 3, 4, 5 a 6. Ve skupině 2 byl mezi 1. a 10. dnem zaznamenán růst hodnot následovaný jejich poklesem 15. i 21. den. Nejvyšší absorbance byla naměřena 21. den ve skupině 6 ($6,489 \pm 0,137$). To je asi dvakrát více než ve skupinách 1, 3 a 4 a téměř desetinásobek absorbance ve skupině 2. Skupiny 5 a 6 byly ovlivněny 2x koncentrovanějším taurinem v osteogenním mediu. Do kulturačního media pro skupinu byl přidáván bFGF.

5.2.4 Metabolická aktivita a aktivita ALP přepočítaná na jednu buňku



Graf č. 23: Metabolická aktivita přepočítaná na jednu buňku pomocí poměru absorbance při 490 nm ku hmotnosti buněčné DNA v experimentu hodnotícím vliv různé koncentrace taurinu na osteogenezi MSC. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání s negativní kontrolou – skupina 1.

Z grafu č. 23 je vidět, že metabolická aktivita přepočítaná na jednu buňku se mezi jednotlivými skupinami první den velmi liší. Nejvyšší úroveň metabolismu byla změřena ve skupinách 1 a 3. Nejnižší naopak ve skupinách 2 a 4. Křivka skupiny 2, do které byl přidáván bFGF v OM od 10. dne experimentu zůstávala na stejné úrovni. Průběžný růst nevykazovala žádná z křivek. Mezi 1. a 15. dnem je vidět pokles buněčného metabolismu ve skupinách 1 a 3. Mezi 15. a 21. dnem metabolická aktivita rostla ve všech skupinách kromě skupiny 5, kde klesala skupiny 2, kde zůstávala na stejné úrovni. Průběžný růst mezi 1. a 15. dnem nebyl pozorován v žádné skupině. K výraznému zvýšení hodnot došlo v závěru experimentu mezi 15. a 21. dnem ve skupinách 1, 3 a 4 a v malé míře také ve skupině 6. Pokles mezi 15. a 21. dnem byl zaznamenán ve skupině 5.



Graf č. 24: Úroveň aktivity alkalické fosfatázy přepočítaná na jednu buňku vydělením absorbance při 405 nm hmotností buněčné DNA v experimentu hodnotícím vliv různé koncentrace taurinu na osteogenezi MSC. Jednotlivé skupiny s přidávanými růstovými faktory v porovnání se negativní kontrolou – skupina 1.

Graf č. 24 ukazuje, že ve skupinách 1, 2, 3 a 4 byla aktivita alkalické fosfatázy první den experimentu vzájemně srovnatelná a nižší než ve skupinách 5 a 6. V prvních deseti dnech hodnoty ve všech skupinách stoupaly. Vzestupný trend byl zachován ve skupinách 1, 4 a 6. Ve skupině 6 bylo dosaženo nejvyšší úrovně aktivity ALP po přepočítání na jednu buňku o velikost 3,428, což je téměř pětinasobek počáteční hodnoty. Pokles mezi 10. a 15. dnem je pozorovatelný ve skupinách 3 a 5. Aktivita ALP buněk ve skupině 2 vykazovala od 10. experimentálního dne mírný pokles.

6 Diskuze

Osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk v podmínkách *in vitro* lze navodit přidáváním některých růstových faktorů a dalších bioaktivních látek do media. Standardně jsou k indukci osteogeneze využívána tzv. osteogenní media s přesně definovaným dávkováním jednotlivých suplementů. Osteogenní medium bylo v této práci používáno jako základní kultivační medium s cílem zajistit buňkám dostatečný přísun minerálních látek pro jejich případné deponování v ECM a poskytnout zdroje anorganického fosfátu – substrátu pro ALP, a askorbátu jakožto kofaktoru syntézy kolagenu. V rámci zkoumání efektu růstových faktorů je lze přidávat do růstového media, do osteogenního media¹⁵¹ nebo případně buňky v osteogenním mediu kultivovat jen po určitou dobu a posléze růstové faktory přidávat do růstového media. Domnívám se, že právě využití osteogenního media přiblížilo podmínky kultivace *in vivo* prostředí co do složení spektra biomolekul ovlivňujících buňky. V případě, že by MSC byly ovlivňovány růstovými faktory v bazálním mediu, docházelo by sice ke zvýšení aktivity ALP, nicméně například bez následné akumulace kalcia a dalších minerálních látek nebo exprese markerů osteogeneze.³⁴

Ve studiích zabývajících se osteogenní diferenciací MSC *in vitro* byly růstové faktory do kultivačního media přidávány samostatně i v kombinacích. V některých případech dokonce v různém časovém sledu. Takové experimenty napodobují časovou posloupnost, ve které působí dané biomolekuly v procesu osteogeneze *in vivo*.^{152,116,153,154,155} Na základě vybraných publikací byly zvoleny růstové faktory a konkrétní koncentrace, jejichž vliv na průběh osteogeneze MSC byl v této práci hodnocen. Byly zkoumány efekty TGF- β , bFGF, VEGF, IGF-1, HGF a BMP-2 a organické kyseliny taurinu. V jednom z uvedených experimentů byly růstové faktory dávkovány v závislosti na fázi kultivace, v ostatních případech byly do media přidávány po celou dobu. Porovnány byly také účinky dvou rozdílných koncentrací taurinu. Diskuze výsledků bude rozdělena do dvou částí – první se bude týkat efektu růstových faktorů a druhá porovnání rozdílných koncentrací taurinu.

Růstové faktory

Pro některé z používaných růstových faktorů byla prokázána i schopnost indukovat diferenciaci MSC v jiné buněčné typy než kostní buňky. Například Havlas a kol. využili TGF- β pro navození chondrogenese.¹⁵⁶ Rovněž bFGF přidávaný do kultivačního media indukuje tvorbu chrupavčité ECM a produkci proteinů specifických pro tkáň chrupavky.¹⁵⁷ bFGF stimuluje mezenchymální kmenové buňky k diferenciaci také do šlach.¹⁵⁸ Jedná se tedy především o pojivové tkáně. Souvisí spolu nejen funkčně, ale chrupavka i vazivo se dočasně vyskytují v místech formace nové kosti. Což vysvětluje různorodý efekt jednoho růstového faktoru na diferenciaci MSC. Buňky byly v každém experimentu kultivovány

po dobu 21 dní, což je dostatečná doba k tomu, aby mohla být zaznamenána počínající osteogenní diferenciace.

Pozitivní efekt na metabolickou aktivitu buněk hodnocenou MTS testem byl pozorován pro růstové faktory bFGF a TGF- β (viz grafy č. 1a, 1b, 6 a 13). Pokud jsou tyto dva růstové faktory zkombinovány, zdá se, že se vzájemně potencují a fungují synergicky, což je závěr shodný se studií zabývající se jejich vzájemnými interakcemi.¹⁵⁹ Společnou molekulou v jejich signálních kaskádách je Ras GTPáza, jejíž aktivace vede až k transkripci genů specifických pro proliferaci buněk. Vzhledem k tomu, že tato GTPáza je součástí také dalších drah od různých typů receptorů, pravděpodobně existují další molekuly zajišťující skládání efektu TGF- β a bFGF, působí-li společně. Jak je patrné z tabulky č. 7 výraznější nárůst buněčného metabolismu byl zaznamenán po přidavku TGF- β . Uvedený růstový faktor podporuje viabilitu buněk a zároveň byl prokázán i jeho pozitivní vliv na proliferaci MSC.¹⁶⁰ Smysl jeho působení je podpora proliferace osteog progenitorových buněk stimulací ERK-MAP-kinázové kaskády.⁸⁶ Tento fakt by se měl projevit rostoucím množstvím buněčné DNA detekovatelným metodou PicoGreen. Takové hodnoty však naměřeny nebyly. Podle některých dat má TGF- β naopak potenciál navozovat senescenci buněk prostřednictvím zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů mitochondriemi.¹⁶¹ Molekula bFGF má mít rovněž mitogenní efekt.¹⁶² Ani toto tvrzení se však nepotvrdilo. Nicméně jak je v grafech č. 2a, 2b, 7 a 14 vidět, při kvantifikaci obsahu buněčné DNA byly naměřeny velké směrodatné odchylky znemožňující identifikaci případných statisticky významných rozdílů. Budeme-li tedy vycházet z grafů dokumentujících vývoj metabolické aktivity buněk, lze pozorovat, že tento trend je v příslušných experimentálních skupinách přítomen. Velký rozptyl hodnot mohl být způsoben chybou v pipetování nebo nedostatečným promísením všech reagensů v jamkách před započítáním měření absorbance. Synergie fungování TGF- β a bFGF je tak silná, že ani signifikantní snížení metabolické aktivity způsobené přidavkem některého z negativně působících růstových faktorů nebylo dostatečně velké, aby efekt dané kombinace klesl na hodnoty kontrolní skupiny.

Buněčný metabolismus byl statisticky významně snížen kombinací VEGF a HGF (viz grafy č. 1a, 1b, 6 a 13). Skupiny, ve kterých byly přítomny každý zvlášť, dosahovaly stejné úrovně buněčného metabolismu jako kontrolní skupina. A tedy samy o sobě tyto růstové faktory metabolickou aktivitu nijak neovlivňovaly. Výsledky naměřené v této práci MTS testem jsou, co se týká vlivu VEGF na buněčný metabolismus a proliferaci, v rozporu s doposud publikovanými studiemi, v nichž je VEGF přisuzován pozitivní vliv na metabolickou aktivitu a proliferaci buněk.^{163,164} HGF má naopak proliferaci MSC inhibovat.¹⁶⁵ V případě, že MSC byly vystaveny působení obou růstových faktorů najednou, docházelo pravděpodobně v některém místě kaskád ke kooperaci a k modulaci účinků. Místo, ve kterém dochází ke kontaktu a k zesílení signálních drah vedoucích od aktivovaných receptorů HGF a VEGF bylo popsáno v práci Sulpiceho a kol. Zdokumentovali, že v buňkách dochází k silné synergické aktivaci stejného setu ERK1/2 a p38 kináz.¹⁶⁶ Výsledné utlumení metabolismu buňky může být následkem mnohonásobně

vyššího počtu aktivovaných molekul nebo jinou kinetikou stimulace kináz. Poslední růstový faktor, u kterého se může zdát, že tlumil metabolickou aktivitu buněk je IGF-1. Podle tabulky č. 7 je ale vidět, že přidavek tohoto růstového faktoru k VEGF + HGF buněčný metabolismus naopak signifikantně zvyšoval oproti samotné dvojkombinaci.

Pokles množství buněčné DNA pozorovatelný v některých skupinách ke konci kultivace mohl být způsoben nedostatečnou komplexitou okolí. Protože buňky byly kultivovány pouze na plastiku, nedocházelo k jejich dostatečné stimulaci fyzickými interakcemi s trojrozměrným mikroprostředím.

Aktivita alkalické fosfatázy, jakožto markeru rané osteogeneze, by měla růst asi do 14. dne kultivace buněk. Jedná se o faktor, který je běžně sledován a využíván k hodnocení míry probíhající osteogenní diferenciaci MSC. V průběhu experimentů při zpracování této práce byla signifikantně vyšší aktivita než v kontrolní skupině naměřena ve skupinách kultivovaných s přidavky VEGF, IGF-1, HGF a 20mM taurinu. Silnější stimulace byla pozorována pro IGF-1 a HGF. Tato data jsou v souladu s výsledky již publikovaných studií.^{118,167,153,120} Stejně tak byly nalezeny práce, které dospěly k závěru, že VEGF, IGF-1 a HGF mohou aktivitu ALP snižovat.^{152,167,168} Pokles aktivity ALP byl pozorován ve skupinách obsahujících kombinaci TGF- β a bFGF (viz grafy č. 3a, 3b, 8 a 15), což je výsledek shodný s dalšími studiemi zabývajícími vlivem růstových faktorů na osteogenní diferenciaci MSC.^{152,159} Aktivita ALP je stimulována Smad3, signální molekulou kaskády TGF- β . Při tlumení aktivity ALP tedy musí být využita jiná signální dráha, než ta zahrnující Smad3. Sowa a kol. prokázali, že činnost ALP je tlumena aktivací drah vedoucích přes kinázy JNK a ERK1/2.¹⁶⁹

Jak je patrné z tabulky č. 8 porovnávací skupiny s a bez přidavku jednoho z uvedených růstových faktorů, efekt jednoho růstového faktoru nebyl ve všech případech stejný. Záleželo na tom, s jakými dalšími růstovými faktory v mediu interagoval. Kombinací IGF-1 nebo taurinu, tedy molekul které samy o sobě aktivitu ALP zvyšovaly, s TGF- β a bFGF bylo dosaženo statisticky významného poklesu oproti samotným TGF- β + bFGF. Také kombinace HGF + VEGF a HGF + IGF-1, kde by se dalo očekávat, že se budou stimulační efekty sčítat prostřednictvím stejných signálních molekul, působily na aktivitu ALP buněk tlumivě. Použitím trojkombinace HGF + VEGF + IGF-1 se míra aktivity ALP vrátila na hladinu shodnou se skupinami se samotným HGF respektive IGF-1. Přidavky většího počtu biomolekul se tedy z pohledu stimulace aktivity ALP jeví jako zbytečné a v některých případech dokonce kontraproduktivní. V jednom z experimentů byl také hodnocen vliv BMP-2 na kultivované buňky. Oproti předpokladu, že tento růstový faktor bude mít stimulační efekt¹⁷⁰, nebylo naměřeno statisticky významné zvýšení oproti skupinám, kam nebyl přidáván. Ve studii Kima a kol. bylo prokázáno, že transkripce genu pro ALP a potažmo aktivita enzymu je nezávislá na transkripčním faktoru RunX2. Přímým pozitivním regulátorem transkripce indukované působením BMP-2 je Dlx5, přímým regulátorem negativním je pak Msx2, jež spolu kompetují o vazbu na specifický element

v promotoru genu pro ALP.¹⁷⁰ V provedeném experimentu nicméně ke stimulaci aktivity ALP nedošlo. Naměřené hodnoty byly buď bez statistické významnosti (skupiny s bFGF + BMP-2 a VEGF + BMP-2) nebo signifikantně nižší než v kontrolní skupině i ve všech ostatních skupinách (skupina s TGF- β + BMP-2). Zda probíhala transkripce genu alkalické fosfatázy, nebylo hodnoceno. Jako výrazný antagonistu stimulačního vlivu BMP-2 pravděpodobně působila signalizace TGF- β , která je naopak výrazným inhibítozem aktivity ALP. Stejný vliv této kombinace růstových faktorů byl již popsán.¹⁷¹ Mechanismus, kterým TGF- β tlumí funkci BMP-2, není znám. Jednou z variant by mohlo být, že TGF- β během svého samostatného působení v první fázi kultivace snižuje expresi povrchových buněčných receptorů pro BMP-2. Kombinace bFGF a VEGF s BMP-2 měly aktivitu ALP podporovat.^{172,154} Přičemž pokud je kombinován bFGF s BMP-2, bylo prokázáno, že zásadním faktem rozhodujícím o konečném efektu je jejich poměr, v němž jsou k buňkám přidávány.¹⁷³

Po zvýšené aktivitě alkalické fosfatázy v procesu osteogenní diferenciace chronologicky následuje mineralizace ECM buněk. ALP hydrolyzuje pyrofosfát a vzniká tak anorganický fosfát, který spolu s ionty vápníku tvoří hydroxyapatit. Krystaly hydroxyapatitu jsou ukládány mezi kolagenními vlákny v ECM. Mineralizace začíná být přítomna kolem 14. dne kultivace.¹⁷⁴ K detekci mineralizace bylo využíváno barvení Alizarinem Red S, který se váže na přítomné soli kalcia. Během experimentů prováděných v rámci této práce byla nejvyšší mineralizace pozorována ve skupinách ovlivňovaných přísávkou taurinu + bFGF +BMP-2, taurinu + VEGF + BMP-2, taurinu + HGF a taurinu + IGF-1. Výsledky získané po inkubaci buněk s BMP-2 jsou v souladu s publikovanými studiemi.¹⁷³ Nicméně ani v případě extracelulární mineralizace není tento růstový faktor neovlivnitelný dalšími molekulami. Stejně jako aktivita ALP, byla i depozice minerálních látek negativně regulována TGF- β . Jak již bylo výše zmíněno, důvodem může být snížení exprese povrchových receptorů pro BMP-2 vlivem působení TGF- β . Podle některých studií se zdá, že TGF- β může osteogenní diferenciaci MSC ovlivňovat také pozitivně a to především v jejích raných fázích. Ve fázi maturace buněk působí naopak tlumivě. Podle Kempena a kol. by mohla být příčinou tohoto dvojího efektu interakce intracelulárních signálních molekul BMP-2 a TGF- β . Nebo fakt, že diferencující buňky na svém povrchu exprimují méně receptorů pro TGF- β než buňky proliferující.¹⁷⁵

Samostatně podávaný taurin má míru mineralizace ovlivňovat přímo úměrně použité koncentraci. V této studii byla jako nejvyšší koncentrace použita 10 mM.¹²⁰ Provedené experimenty však tento závěr nepotvrdily. Pokud byl do kultivačního média přidáván pouze taurin, nebyla ani 21. den detekována žádná mineralizace. To naznačuje, že ve skupinách s přísávkou taurin + bFGF +BMP-2 a taurin + VEGF + BMP-2 byla přítomná mineralizace indukována působením především BMP-2 a nikoli taurinu. Dále byly minerální látky ukládány v ECM buněk ovlivněných taurinem + IGF-1 a taurinem + HGF. Studie zkoumající efekt uvedených dvoukombinací na osteogenní diferenciaci MSC prozatím

nebyly publikovány. Jsou pouze známy některé interakce v jiných buněčných typech. Například v buňkách kosterní svaloviny dochází působením IGF-1 ke zvýšení aktivity taurinového transporteru.¹⁷⁶ IGF-1 patří mezi molekuly, jejichž syntéza je podporována cvičením. Stejným mechanismem by taurin mohl ovlivňovat také diferencující MSC případně již maturující osteoblasty. Fyzickou aktivitou by tak bylo možné dosáhnout zvýšení mineralizace kostní ECM a zpevnění kostí. O přímých interakcích HGF a taurinu nic známo není. Také HGF by mohl zvyšovat aktivitu transporteru taurinu. Bylo prokázáno, že taurin stimuluje osteogenní procesy aktivací ERK 1/2 kináz.¹²⁰ Rovněž HGF aktivuje tento typ kináz a v tomto místě by tedy mohlo docházet k synergii.

Další využívanou metodou bylo fluorescenční barvení a snímání konfokálním mikroskopem s cílem ohodnotit adhezi buněk (viz obrázky č. 14 a 15). První den byl ve všech skupinách pozorovatelný stejný počet buněk se shodnou morfologií jader a cytoskeletu. 21. den byly ve skupině vystavené působení TGF- β + bFGF pozorovatelné buňky, jejichž jádra byla protáhlejší než v ostatních skupinách. Ve všech skupinách kromě skupiny s přísadky TGF- β + bFGF byly pozorovány jasněji červeně svítící struktury – aktinový cytoskelet vizualizovaný phalloidinem s fluorescenční značkou. Tyto struktury však nebyly pozorovány při opakovaném snímání preparátu, v němž při prvním snímání viditelné nebyly. Lze tak usuzovat, že se nejedná o artefakt vzniklý během časové prodlevy mezi barvením a snímáním. Možná tedy půjde o cytoskeletární struktury přítomné v buňkách jako následek diferenciačních procesů. V nediferencovaných buňkách – tedy z prvního experimentálního dne lze vidět aktinová vlákna souběžně uspořádaná. Jedním z morfologických znaků diferencujících buněk je přestavba aktinového cytoskeletu, kdy jsou jednotlivá vlákna poskládána přes sebe.¹⁷⁷ Vzhledem k vysokému počtu buněk ve vzorcích se však buňky překrývaly a stavba cytoskeletu tak nebyla dostatečně viditelná. Uspořádání vláken charakteristické pro nediferencované buňky bylo 21. den pozorovatelné snad jen ve skupině obsahující TGF- β a bFGF, což je v souladu s nízkou aktivitou ALP a nepřítomnou mineralizací. Těžko lze hodnotit také počet buněk v jednotlivých skupinách. Nicméně porovnáme-li snímky s naměřeným množstvím buněčné DNA, kde se mezi sebou jednotlivé skupiny příliš nelišily, lze vidět, že i tato data se shodují.

Hodnocení míry exprese mRNA osteogenního transkripčního faktoru RunX2 a proteinu kolagenu typu I (zobrazeno v grafech č. 11, 12, 18 a 19) vedlo k některým překvapivým výsledkům. Nejvyšší hodnoty exprese RunX2 byly naměřeny ve skupinách s přísadky TGF- β a/nebo bFGF, případně taurinu + bFGF a taurinu + TGF- β . Nicméně ve skupinách, kam byl přidáván buď pouze taurin nebo taurin s dalšími růstovými faktory (HGF, IGF-1), byla míra exprese RunX2 naopak snížena. V případě kolagenu typu I byla signifikantně nejvyšší exprese naměřena ve skupině s přísadky TGF- β + bFGF,

pokud byly podávány zároveň. Nižších hodnot než v kontrolní skupině bylo dosaženo ve skupinách kultivovaných s taurinem, taurinem + bFGF, taurinem + HGF a taurinem + IGF-1.

Přidávky bFGF do kultivačního media mají expresi RunX2 stimulovat například podle Kim a kol., Franceschi a kol. nebo Pratap a kol.^{178,179,180} Rovněž pro TGF- β bylo popsáno, že dokáže navodit expresi tohoto růstového faktoru. Po vazbě TGF- β na receptor dochází ke konvergenci Smad signalizace a p38 MAP-kinázové kaskády a indukci exprese RunX2. RunX2 tvoří komplexy s TCF-4 a společně fungují jako koaktivátory exprese TGF β R1.⁸⁶ Podle další studie TGF- β naopak tlumí expresi RunX2 utlumením exprese Dlx5, což je molekula kterou je exprese RunX2 indukována působením BMP-2.¹⁸¹ Právě závěr, že BMP-2 má podporovat expresi RunX2 se neshoduje s daty získanými z experimentů v této práci. Přídavek BMP-2 v druhé fázi kultivace tedy v rozporu s publikovanými studiemi¹⁵⁴ expresi RunX2 nestimuloval. Míra jeho exprese byla dokonce signifikantně nižší než ve skupinách, kam BMP-2 přidáván nebyl. BMP-2 byl do kultivačních medií přidáván v kombinacích s dalšími biomolekulami – BMP-2 + bFGF+ taurin, BMP-2 + TGF- β + taurin, BMP-2 + VEGF + taurin. Taurin je další látkou, která má stimulovat expresi RunX2 a to přímo úměrně použité koncentraci. Tento efekt byl zkoumán pouze do koncentrace taurinu 10 mM.¹²⁰ Data získaná v průběhu této práce nebyla v souladu s tímto závěrem. Při zvýšení koncentrace na 20 mM byla míra exprese signifikantně nižší než v kontrolní skupině. Při koncentraci 10 mM byla exprese signifikantně vyšší než v kontrolní skupině, ale zároveň signifikantně nižší než ve všech ostatních skupinách. Vliv VEGF na indukci exprese RunX2 je nepřímý. Vazbou na svůj povrchový receptor VEGF aktivuje Ras-MAP-kinázovou signální dráhu, která reguluje transkripci genů pro bFGF a BMP-2.¹⁵⁴ A jak bylo výše zmíněno, tyto dva růstové faktory vedou k expresi RunX2 přímo.

Expresi kolagenu typu I na základě TGF- β signalizace je pozitivně regulována činností stejné kinázy jako RunX2 – p38 MAP.⁸⁶ Podle Ornitz a kol. a Park a kol. má bFGF na expresi Coll negativní efekt na základě aktivace transkripčního faktoru Twist.^{182,183} Výsledky naměřené v průběhu experimentů v této práci byly v souladu s touto studií pouze pokud bFGF nebyl kombinován s TGF- β . V takovém případě byla exprese Coll naopak vyšší než v kontrolní skupině. Do některých experimentálních skupin byl přidáván také taurin. Dosud však nebyly publikovány studie, které by se zabývaly hodnocením vlivu taurinu na expresi kolagenu typu I v rámci osteogenních diferenciací MSC. Expresi Coll byla v experimentech v této práci zvýšena nad úroveň kontrolní skupiny ve skupinách, kam byl přidáván taurin o koncentraci 10 mM jak samostatně, tak v kombinaci s některými růstovými faktory. Mezi jednotlivými skupinami však rozdíl nebyl. Vymykala se pouze skupina, která kromě taurinu obsahovala také bFGF a ve které bylo dosaženo úrovně exprese jako v kontrolní skupině. Je tedy možné, že negativní efekt bFGF byl silnější než pozitivní efekt taurinu. bFGF by mohl snižovat aktivitu taurinového transporteru. Případně by mohlo docházet k interakcím intracelulárních signálních drah. V experimentu hodnotícím vliv dvojnásobné koncentrace taurinu (20 mM) byla ve všech skupinách naměřena statisticky významně nižší míra exprese Coll. Taková koncentrace může být natolik

suprafyziologická, že přímá úměra použité koncentrace a pozitivního efektu již neplatí a procesy osteogenní diferenciace jsou naopak inhibovány bez ohledu na to, s jakými dalšími biomolekulami je taurin kombinován.

Taurin

Naměřená data z experimentů zabývajících se vlivem rozdílných koncentrací taurinu (10 a 20 mM) na metabolickou aktivitu a proliferaci MSC jsou uvedena v grafu č. 20. Signifikantně nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve skupině kultivované s přidavky 10 mM taurinu a bFGF. Vzhledem k tomu, že samotný bFGF stejně silný vliv nevykazoval, lze usuzovat, že taurin v této koncentraci působí stimulačně na buněčný metabolismus. Tento závěr je v souladu se studií Jeon a kol.¹⁸⁴ Nicméně s touto samou studií je v rozporu závěr ohledně 20 mM koncentrace taurinu, která měla úroveň buněčného metabolismu ještě zvýšit. V průběhu experimentů byla ve skupinách obsahující 20mM taurin totiž naměřena signifikantně nižší metabolická aktivita než ve skupinách s 10 mM taurinem. Rovněž množství buněčné DNA (graf č. 21) koresponduje s daty z MTS testu a bylo ve skupinách s 20 mM taurinem signifikantně nízké. V případě kultivace buněk s 20 mM taurinem se neprojevil pozitivní efekt bFG. V tomto experimentu však nebylo pozorováno tak výrazné zvýšení buněčného metabolismu a proliferace buněk jako tomu bylo v experimentech předchozích.

Aktivita ALP (viz graf č. 22) byla signifikantně nejnižší pozorována ve skupině s přidavky bFGF. Toto měření je tedy v souladu s některými výše zmíněnými studiemi.^{152,159} Úroveň aktivity ALP buněk byla srovnatelná s negativní kontrolou ve skupinách s přidavky 10 mM taurinu. Statisticky výrazně vyšší pak byla úroveň ve skupinách s 20 mM koncentrací taurinu. Tento závěr je ve shodě se studií zabývajících se efekty různých koncentrací taurinu na osteogenezi MSC.¹²⁰

Rozdíly v efektech jednoho růstového faktoru v publikovaných studiích a v této práci mohou mít několik příčin. Především různé koncentrace mohou mít na stejné buňky velice odlišný vliv. Dalším faktorem je frekvence výměny media. Stabilita růstových faktorů v mediu je různá, v průměru asi jeden den. Mezi jednotlivými výměnami je tedy růstový faktor degradován a každá výměna s sebou přináší náhlé zvýšení jeho koncentrace. Buňky jsou tak v tomto směru vystaveny pulzování namísto kontinuálně stejné hladině. Zásadním faktem je, že buňky byly získávány od lidských dárců a jako takové se od sebe mohou významně lišit co do schopnosti a míry reakce na extracelulární podněty včetně signálních molekul.

7 Závěr

Hlavním cílem práce bylo otestovat různé kombinace a koncentrace růstových faktorů a dalších biomolekul s ohledem na proliferaci, metabolickou aktivitu a indukci osteogenní diferenciace lidských mezenchymálních kmenových buněk *in vitro*. Nalezenou optimální kombinací by bylo možné funkcionalizovat nanovláknenný nosič, z něhož by inkorporované látky postupně uvolňovaly a stimulovaly tak buňky ve svém okolí.

Signifikantně nejvyšších hodnot metabolické aktivity bylo dosaženo ve skupinách kultivovaných s přidavky TGF- β a bFGF ať už v kombinaci nebo samostatně působícími. Pokud byly kombinovány, působily synergicky. Ve skupinách byl pozorován různý průběh vývoje úrovně buněčného metabolismu. Množství buněčné DNA se v některých experimentech nepodařilo dostatečně kvantifikovat, protože byly naměřeny hodnoty s příliš velkým rozptylem.

Aktivita alkalické fosfatázy byla naměřena se statisticky nejvýznamnějšími rozdíly ve skupinách, kde byly buňky ovlivněny VEGF, IGF-1 a HGF. BMP-2 podávaný v pozdní fázi osteogenní diferenciace neměl oproti očekávání na aktivitu ALP žádný stimulační efekt. Kultivace buněk s taurinem o koncentraci 20 mM činnost ALP rovněž stimulovala. Aktivita ALP byla na nižší úrovni ve skupinách s TGF- β a bFGF. Ve většině skupin dosáhla ALP maxima své aktivity 10. nebo 15. den.

Mineralizace byla nejvíce podpořena ve skupinách vystavených působení 10 mM taurinu + bFGF + BMP-2, 10 mM taurinu + VEGF + BMP-2, 20 mM taurinu + HGF, 20 mM taurinu + IGF-1. Projevila se zde schopnost taurinu stimulovat aktivitu ALP přímo úměrně použité koncentraci. Mineralizace byla naopak nižší ve skupinách obsahujících TGF- β a bFGF.

Konfokální mikroskopie neprokázala žádné změny morfologie buněk.

Při hodnocení míry exprese osteogenních markerů RunX2 a kolagenu typu I byl jako normalizační gen využit EEF-1. Nejvíce mRNA pro RunX2 i Coll bylo naměřeno ve skupinách s přidavky TGF- β a bFGF.

V průběhu práce byl hodnocen vliv také několika dosud nezkoumaných kombinací růstových faktorů a taurinu. Získaná data přispěla k rozšíření poznatků o vlivu růstových faktorů na osteogenní diferenciaci lidských MSC a jsou potenciálně dále využitelná při vývoji nebuněčného nosiče využitelného při terapii kostních defektů. Jak je však z výsledků patrné, efekty jednotlivých růstových faktorů a jejich kombinací jsou různorodé a často obtížně předpokladatelné. Je tedy důležité provést další studie zabývající se detailnějším zkoumáním mechanismu jejich působení. A to především v případě praktických aplikací v tkáňovém inženýrství.

8 Zdroje

1. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71–4 (1997).
2. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–74 (1976).
3. Pittenger, M. F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-.). **284**, 143–147 (1999).
4. Kolf, C. M., Cho, E. & Tuan, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 204 (2007).
5. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7 (2006).
6. Quirici, N. *et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* **30**, 783–91 (2002).
7. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25 (1978).
8. Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2506–19 (2014).
9. Legate, K. R., Wickström, S. A. & Fässler, R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* **23**, 397–418 (2009).
10. Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 285–96 (2008).
11. Haque, N., Rahman, M. T., Abu Kasim, N. H. & Alabsi, A. M. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal.* **2013**, 632972 (2013).
12. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–13 (2006).
13. Shi, S. & Gronthos, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 696–704 (2003).
14. Wagner, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* **33**, 1402–16 (2005).
15. Wang, H.-S. *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton’s jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**, 1330–7 (2004).

16. Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A. & Mobasheri, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* (2015). doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.016
17. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* **9**, 12 (2011).
18. Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z. & Hedrick, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **24**, 150–4 (2006).
19. Fernández Vallone, V. B. *et al.* Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? *Differentiation.* **85**, 1–10 (2013).
20. Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–506 (2007).
21. Mattar, P. & Bieback, K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front. Immunol.* **6**, 560 (2015).
22. Shi, M., Liu, Z.-W. & Wang, F.-S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 1–8 (2011).
23. Susumu Ikehara, M. L. Immunomodulatory Properties and Therapeutic Application of Bone Marrow Derived-Mesenchymal Stem Cells. *J. Bone Marrow Res.* **01**, (2013).
24. Prockop, D. J. & Oh, J. Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* **20**, 14–20 (2012).
25. Sumanasinghe, R. D., Pfeiler, T. W., Monteiro-Riviere, N. A. & Lobo, E. G. Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain. *J. Cell. Physiol.* **219**, 77–83 (2009).
26. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–36 (2008).
27. Karp, J. M. & Leng Teo, G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* **4**, 206–16 (2009).
28. Yagi, H. *et al.* Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* **19**, 667–79 (2010).
29. Ryu, C. H. *et al.* Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 105–10 (2010).
30. Ries, C. *et al.* MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human

- mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* **109**, 4055–63 (2007).
31. Ho, I. A. W. *et al.* Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. *Stem Cells* **27**, 1366–75 (2009).
 32. Patel, D. M., Shah, J. & Srivastava, A. S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int.* **2013**, 496218 (2013).
 33. Firth, A. L. & Yuan, J. X.-J. Identification of functional progenitor cells in the pulmonary vasculature. *Pulm. Circ.* **2**, 84–100
 34. Vater, C., Kasten, P. & Stiehler, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* **7**, 463–77 (2011).
 35. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–95 (2004).
 36. Wang, C.-Y. *et al.* Apoptosis in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells: effect of serum and medium supplements. *Apoptosis* **15**, 439–49 (2010).
 37. Sorger, J. I. *et al.* Allograft fractures revisited. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 66–74 (2001). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154007>>
 38. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**, 385–96 (2006).
 39. Song, I.-H., Caplan, A. I. & Dennis, J. E. In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. *J. Orthop. Res.* **27**, 916–21 (2009).
 40. Kielty, C. M. & Grant, M. E. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. (John Wiley & Sons, Inc., 2002). doi:10.1002/0471221929
 41. Hildebrandt, C., Büth, H. & Thielecke, H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann. Anat.* **191**, 23–32 (2009).
 42. Maehata, Y. *et al.* Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic cells: roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol.* **25**, 47–58 (2006).
 43. Kim, N. & Cho, S.-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* **28**, 387–402 (2013).
 44. Harting, M. T. *et al.* Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* **110**, 1189–97 (2009).
 45. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**, S131–9 (2008).

46. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**, 385–96 (2006).
47. Mackie, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1301–5 (2003).
48. Caetano-Lopes, J., Canhão, H. & Fonseca, J. E. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reum. Port.* **32**, 103–10
49. Rubin, C. T. & Lanyon, L. E. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J. Orthop. Res.* **5**, 300–310 (1987).
50. Henkel, J. *et al.* Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res.* **1**, 216–48 (2013).
51. Gilbert, S. F. Osteogenesis: The Development of Bones. (2000). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056/>
52. Berendsen, A. D. & Olsen, B. R. Bone development. *Bone* **80**, 14–8 (2015).
53. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747–54 (1997).
54. Fujisawa, R. & Tamura, M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **17**, 1891–903 (2012).
55. Eriksen, E. F., Axelrod, D. W. & Melsen, F. *Bone Histomorphometry*. (1994). at https://books.google.cz/books/about/Bone_Histomorphometry.html?id=4PdnQgAACAAJ&pgis=1
56. Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5**, 222–6 (2003).
57. Golub, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1592–8 (2009).
58. Cadigan, K. M. Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* **119**, 395–402 (2006).
59. Westendorf, J. J., Kahler, R. A. & Schroeder, T. M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* **341**, 19–39 (2004).
60. Krishnan, V. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 1202–1209 (2006).
61. Hartmann, C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* **16**, 151–8 (2006).
62. Bennett, C. N. *et al.* Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3324–9 (2005).
63. Marie, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 98–105 (2008).
64. James, A. W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. **2013**, 684736 (2013).

65. Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. & Tabin, C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401–16 (1993).
66. Simpson, F., Kerr, M. C. & Wicking, C. Trafficking, development and hedgehog. *Mech. Dev.* **126**, 279–88
67. Hojo, H. *et al.* Gli1 protein participates in Hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* **287**, 17860–9 (2012).
68. Karin, M. Too many transcription factors: positive and negative interactions. *New Biol.* **2**, 126–31 (1990).
69. Kirkham, G. R. *et al.* Early gene regulation of osteogenesis in embryonic stem cells. *Integr. Biol. (Camb)*. **4**, 1470–7 (2012).
70. Xiao, G. *et al.* MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J. Biol. Chem.* **275**, 4453–9 (2000).
71. Lee, B. *et al.* Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat. Genet.* **16**, 307–10 (1997).
72. Dobrev, G. *et al.* SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell* **125**, 971–86 (2006).
73. Westendorf, J. J. Transcriptional co-repressors of Runx2. *J. Cell. Biochem.* **98**, 54–64 (2006).
74. Zhao, M. *et al.* Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 12854–9 (2004).
75. Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29 (2002).
76. Lee, M.-H., Kwon, T.-G., Park, H.-S., Wozney, J. M. & Ryoo, H.-M. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 689–94 (2003).
77. Harada, H. *et al.* Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 6972–8 (1999).
78. Chu, S. & Ferro, T. J. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* **348**, 1–11 (2005).
79. Hassan, M. Q. *et al.* Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9248–61 (2004).
80. Williams, S. A. *et al.* USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell* **146**, 918–30 (2011).
81. Lasorella, A., Benezra, R. & Iavarone, A. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 77–91 (2014).

82. Yang, X. *et al.* ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **117**, 387–98 (2004).
83. Ali, A. A. *et al.* Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* **146**, 1226–35 (2005).
84. Dhawan, P. *et al.* Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 472–87 (2005).
85. Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T. & Einhorn, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* **88**, 873–84 (2003).
86. Chen, G., Deng, C. & Li, Y.-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 272–88 (2012).
87. Massagué, J., Attisano, L. & Wrana, J. L. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* **4**, 172–8 (1994).
88. Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1805–1815 (1999).
89. Bosnakovski, D. *et al.* Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 1152–63 (2006).
90. Mohan, S. & Baylink, D. J. Bone growth factors. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 30–48 (1991). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993386>>
91. Cao, X. & Chen, D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* **357**, 1–8 (2005).
92. José A. Andrades, L. N.-L. L. C.-T. A. P. C.-A. D. L.-G. M. L. M.-A. and J. A. M.-M. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. (InTech, 2013). doi:10.5772/46192
93. Noël, D. *et al.* Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **22**, 74–85 (2004).
94. Andrades, J. A. *et al.* A Modified rhTGF- β 1 and rhBMP-2 Are Effective in Initiating a Chondro-Osseous Differentiation Pathway in Bone Marrow Cells Cultured In Vitro. *Connect. Tissue Res.* **44**, 188–197 (2015).
95. Valcourt, U., Gouttenoire, J., Moustakas, A., Herbage, D. & Mallein-Gerin, F. Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 33545–58 (2002).
96. Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **19**, 128–39 (2009).
97. Matsunobu, T. *et al.* Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial

- formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev. Biol.* **332**, 325–38 (2009).
98. Yoshida, Y. *et al.* Negative Regulation of BMP/Smad Signaling by Tob in Osteoblasts. *Cell* **103**, 1085–1097 (2000).
 99. Sonia Villapol, T. T. L. and A. J. S. *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*. (InTech, 2013). doi:10.5772/3445
 100. Marie, P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* **316**, 23–32 (2003).
 101. Marie, P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene* **498**, 1–4 (2012).
 102. Choi, S.-C. *et al.* Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells Dev.* **17**, 725–36 (2008).
 103. Su, N., Jin, M. & Chen, L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Res.* **2**, 14003 (2014).
 104. Fei, Y., Xiao, L., Doetschman, T., Coffin, D. J. & Hurley, M. M. Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 40575–83 (2011).
 105. Bichell, D. P., Rotwein, P. & McCarthy, T. L. Prostaglandin E2 rapidly stimulates insulin-like growth factor-I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology* **133**, 1020–8 (1993).
 106. Canalis, E., Centrella, M., Burch, W. & McCarthy, T. L. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest.* **83**, 60–5 (1989).
 107. Locatelli, V. & Bianchi, V. E. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, 1–25 (2014).
 108. Guntur, A. R. & Rosen, C. J. IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. *Bonekey Rep.* **2**, (2013).
 109. Hernández-Sánchez, C., Blakesley, V., Kalebic, T., Helman, L. & LeRoith, D. The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 29176–81 (1995).
 110. Long, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells. Mol. Dis.* **27**, 677–90
 111. Meyer-Ingold, W. & Eichner, W. Platelet-derived growth factor. *Cell Biol. Int.* **19**, 389–98 (1995).
 112. Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. Molecular

- mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J. Dent. Res.* **87**, 107–18 (2008).
113. Yang, Y.-Q. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int. J. Oral Sci.* **4**, 64–8 (2012).
 114. Mayer, H. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J. Cell. Biochem.* **95**, 827–39 (2005).
 115. Roy, H., Bhardwaj, S. & Ylä-Herttuala, S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* **580**, 2879–87 (2006).
 116. Aenlle, K. K., Curtis, K. M., Roos, B. A. & Howard, G. A. Hepatocyte growth factor and p38 promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mol. Endocrinol.* **28**, me20131286 (2014).
 117. Hu, Y., Chan, E., Wang, S. X. & Li, B. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation. *Endocrinology* **144**, 2068–74 (2003).
 118. Wen, Q. *et al.* Change in hepatocyte growth factor concentration promote mesenchymal stem cell-mediated osteogenic regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 1260–73 (2012).
 119. Bröer, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* **88**, 249–86 (2008).
 120. Zhou, C. *et al.* Taurine promotes human mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblast through the ERK pathway. *Amino Acids* (2014). doi:10.1007/s00726-014-1729-8
 121. Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 45–54 (2015).
 122. Dimitriou, R., Tsiridis, E. & Giannoudis, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* **36**, 1392–404 (2005).
 123. Phillips, A. M. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* **36 Suppl 3**, S5–7 (2005).
 124. Bostrom, M. P. *et al.* Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J. Orthop. Res.* **13**, 357–67 (1995).
 125. Hollinger, J. O., Hart, C. E., Hirsch, S. N., Lynch, S. & Friedlaender, G. E. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* **90 Suppl 1**, 48–54 (2008).
 126. Deckers, M. M. L. *et al.* Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* **143**, 1545–53 (2002).
 127. Harrell, D. B. *et al.* Non-hematopoietic essential functions of bone marrow cells: a review of scientific and clinical literature and rationale for treating bone defects. *Orthopedic Reviews* **7**, (2015).

128. Spira, M., Fissette, J., Hall, W., Hardy, S. B. & Gerow, F. J. Evaluation of synthetic fabrics as artificial skin grafts to experimental burn wounds. *J. Biomed. Mater. Res.* **3**, 213–34 (1969).
129. Tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **18**, IT56–IT58 (2000).
130. Amini, A. R., Laurencin, C. T. & Nukavarapu, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **40**, 363–408 (2012).
131. Lichte, P., Pape, H. C., Pufe, T., Kobbe, P. & Fischer, H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury* **42**, 569–73 (2011).
132. Finkemeier, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone Joint Surg. Am.* **84-A**, 454–64 (2002).
133. Delloye, C., Cornu, O., Druetz, V. & Barbier, O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J. Bone Joint Surg. Br.* **89**, 574–9 (2007).
134. Shibuya, N. & Jupiter, D. C. Bone graft substitute: allograft and xenograft. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **32**, 21–34 (2015).
135. biokompatibilita | Velký lékařský slovník On-Line. at
<<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/biokompatibilita>>
136. Saiz, E., Zimmermann, E. A., Lee, J. S., Wegst, U. G. K. & Tomsia, A. P. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent. Mater.* **29**, 103–15 (2013).
137. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10 Suppl 2**, S96–101 (2001).
138. Carlsson, L. V *et al.* Stepwise introduction of a bone-conserving osseointegrated hip arthroplasty using RSA and a randomized study: II. Clinical proof of concept--40 patients followed for 2 years. *Acta Orthop.* **77**, 559–66 (2006).
139. Rouwkema, J., Rivron, N. C. & van Blitterswijk, C. A. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **26**, 434–41 (2008).
140. Bose, S., Roy, M. & Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* **30**, 546–54 (2012).
141. Velasco, M. A., Narváez-Tovar, C. A. & Garzón-Alvarado, D. A. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res. Int.* **2015**, 729076 (2015).
142. Giannoudis, P. V, Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. *Injury* **36 Suppl 3**, S20–7 (2005).
143. Ludwig, S. C. & Boden, S. D. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop. Clin. North Am.* **30**, 635–45 (1999).
144. Dabrowski, B., Swieszkowski, W., Godlinski, D. & Kurzydowski, K. J. Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **95**, 53–61

- (2010).
145. Agarwal, S., Wendorff, J. H. & Greiner, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer (Guildf)*. **49**, 5603–5621 (2008).
 146. Yoo, H. S., Kim, T. G. & Park, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1033–42 (2009).
 147. Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S. & Ramkumar, S. S. Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **96**, 557–569 (2005).
 148. Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 2223–2253 (2003).
 149. Fengyu Li, Y. Z. and Y. S. *Nanofibers*. (InTech, 2010). doi:10.5772/45660
 150. Xavier, J. R. *et al.* Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS Nano* **9**, 3109–18 (2015).
 151. Lu, J. *et al.* Effect of fibroblast growth factor 9 on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells and dental pulp stem cells. *Mol. Med. Rep.* **11**, 1661–8 (2015).
 152. Huang, Z., Ren, P.-G., Ma, T., Smith, R. L. & Goodman, S. B. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine* **51**, 305–10 (2010).
 153. Wang, S. *et al.* Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res.* **8**, 346–56 (2012).
 154. Li, P. *et al.* Synergistic and sequential effects of BMP-2, bFGF and VEGF on osteogenic differentiation of rat osteoblasts. *J. Bone Miner. Metab.* (2013). doi:10.1007/s00774-013-0538-6
 155. Gurkan, U. A., Gargac, J. & Akkus, O. The sequential production profiles of growth factors and their relations to bone volume in ossifying bone marrow explants. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2295–306 (2010).
 156. Havlas, V. *et al.* [Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells]. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* **78**, 138–44 (2011).
 157. Park, K. H. & Na, K. Effect of growth factors on chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal cells embedded in injectable hydrogels. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 74–9 (2008).
 158. Hankemeier, S. *et al.* Modulation of Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells by Fibroblast Growth Factor 2 : **11**, (2005).
 159. Bosetti, M., Boccafroschi, F., Leigheb, M. & Cannas, M. F. Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering. *Biomol. Eng.* **24**, 613–8 (2007).

160. Jian, H. *et al.* Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* **20**, 666–74 (2006).
161. Wu, J. *et al.* TGF-β1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Dev. Biol.* **14**, 21 (2014).
162. Benavente, C. A., Sierralta, W. D., Conget, P. A. & Minguell, J. J. Subcellular distribution and mitogenic effect of basic fibroblast growth factor in mesenchymal uncommitted stem cells. *Growth Factors* **21**, 87–94 (2003).
163. Rodrigues, M., Griffith, L. G. & Wells, A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* **1**, 32 (2010).
164. Kong, X. *et al.* [VEGF promotes the proliferation of bone marrow derived mesenchymal stem cells through ERK1/2 signal pathway]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **18**, 1292–6 (2010).
165. Forte, G. *et al.* Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells* **24**, 23–33 (2006).
166. Sulpice, E. *et al.* Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol. Cell* **101**, 525–39 (2009).
167. Lee, J.-H., Um, S., Jang, J.-H. & Seo, B. M. Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell Tissue Res.* **348**, 475–84 (2012).
168. Standal, T. *et al.* HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood* **109**, 3024–30 (2007).
169. Sowa, H., Kaji, H., Yamaguchi, T., Sugimoto, T. & Chihara, K. Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 36024–31 (2002).
170. Kim, Y.-J., Lee, M.-H., Wozney, J. M., Cho, J.-Y. & Ryoo, H.-M. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J. Biol. Chem.* **279**, 50773–80 (2004).
171. Spinella-Jaegle, S. *et al.* Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* **29**, 323–30 (2001).
172. Wang, L., Huang, Y., Pan, K., Jiang, X. & Liu, C. Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 77–87 (2010).
173. Kempen, D. H. R. Bone regeneration based on growth factor releasing polymer composites. (2011). at <<http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/216825>>
174. Orimo, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* **77**, 4–12 (2010).

175. Kempen, D. H. R. *et al.* Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **16**, 551–66 (2010).
176. Park, S.-H., Lee, H. & Park, T. Cortisol and IGF-1 synergistically up-regulate taurine transport by the rat skeletal muscle cell line, L6. *Biofactors* **21**, 403–6 (2004).
177. Yourek, G., Hussain, M. A. & Mao, J. J. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO J.* **53**, 219–28
178. Kim, H.-J., Kim, J.-H., Bae, S.-C., Choi, J.-Y. & Ryoo, H.-M. The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *J. Biol. Chem.* **278**, 319–26 (2003).
179. Franceschi, R. T. & Xiao, G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J. Cell. Biochem.* **88**, 446–54 (2003).
180. Pratap, J. *et al.* Cell Growth Regulatory Role of Runx2 during Proliferative Expansion of Preosteoblasts. *Cancer Res.* **63**, 5357–5362 (2003).
181. Lee, M.-H. *et al.* BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 34387–94 (2003).
182. Ornitz, D. M. & Marie, P. J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* **16**, 1446–65 (2002).
183. Park, D.-S. *et al.* Effect of FGF-2 on collagen tissue regeneration by human vertebral bone marrow stem cells. *Stem Cells Dev.* **24**, 228–43 (2015).
184. Jeon, S.-H. *et al.* Taurine increases cell proliferation and generates an increase in [Mg²⁺]_i accompanied by ERK 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett.* **581**, 5929–34 (2007).